

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOSÉ CARLOS DA COSTA JUNIOR

**QUALIDADE SANITÁRIA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE PUPUNHEIRA
SUBMETIDAS A TRATAMENTO QUÍMICO E CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS
DA PODRIDÃO DA BASE DO ESTIPE CAUSADA POR *FUSARIUM* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Agronomia, Área de Concentração em Produção
Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo,
Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do
Paraná, como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

CURITIBA – PR

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pelo candidato **JOSÉ CARLOS DA COSTA JUNIOR**, sob o título “QUALIDADE SANITÁRIA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE PUPUNHEIRA SUBMETIDAS AO TRATAMENTO QUÍMICO E CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS DA PODRIDÃO DA BASE DO ESTIPE CAUSADA POR *Fusarium spp.*”, para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2013.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Professor Dr. Wilson da Silva Moraes
Primeiro Examinador

Professor Dr. Dauri José Tessmann
Segundo Examinador

Dr. Alvaro Figueredo dos Santos
Presidente da Banca e Orientador

Dedico esta obra a Deus e aos meus familiares, imprescindíveis alicerces da minha vida. Aos meus pais, José Carlos da Costa e Doroti Afonso da Costa, à minha irmã Marciane Afonso da Costa, à minha avó Maria Locatelli da Costa e à minha namorada Priscila Gruber.

AGRADECIMENTOS

Agradeço hoje, ontem e sempre a Deus por todas suas bênçãos, e pela maravilhosa família que me concedeu. Desta família, de onde vem minhas forças para continuar seguindo em frente;

Agradeço aos meus pais, José Carlos da Costa e Doroti Afonso da Costa pelo carinho, amor, companheirismo e dedicação, durante todos os anos da minha formação. Aos familiares próximos, em especial minha irmã Marciane Afonso da Costa, e avó Maria Locatelli da Costa, que contribuíram para minha formação e caráter, apoiando-me sempre em todos os momentos;

À minha namorada, Priscila Gruber, e seus familiares, pelo companheirismo, paciência e apoio prestados até o presente momento;

Agradeço ao Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos e ensinamentos, proporcionando um elevado enriquecimento científico. Sou grato por sua orientação sensata, e a serena forma de conduzir os trabalhos;

Meus respeitosos agradecimentos ao Dr. Wilson da Silva Moraes, Pesquisador da APTA, polo regional do Vale do Ribeira e Professor da UNESP - Registro, pelas sugestões e orientações na redação deste trabalho.

Ao Professor Dr. Dauri José Tessmann, meus agradecimentos pela participação na banca examinadora da defesa e pela identificação dos isolados de *Fusarium* spp., assim como ao Carlos A. Inácio, da UFRRJ, pela identificação do basidiomiceto encontrado em lotes de sementes de pupunheira;

Ao prof. Dr. Marcos A. Dolinski, pelas recomendações feitas na pré-defesa;

Aos funcionários do Laboratório de Sementes Florestais da Embrapa Floresta, em especial ao laboratorista Adilson Tomaschitz, por todo o auxílio prestado, e à Dra. Elisa Serra Negra Vieira, pelas sugestões e orientações com relação aos testes de qualidade das sementes;

À Embrapa Florestas e Laboratório de Patologia Florestal, por permitir uso das instalações para realização do presente trabalho; Ao convívio com funcionários, estudantes e colaboradores: Carol, Celso, David, Edilson, Édson, Francine, Hágata, Joel, José Antônio, Karen, Lucimara, Paula, Pedro e Thaísa, todos que, de alguma forma, participaram ou estiveram presentes em algum momento da realização do presente trabalho;

À coordenação do programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da UFPR, à Prof. Dra. Louise Larissa May De Mio, pelas orientações e ensinamentos; também à Lucimara Antunes e demais funcionários do departamento de Fitotecnia.

Estendo minha gratidão a todos os professores de graduação e pós-graduação do Curso de Agronomia da Universidade Federal do Paraná, que tiveram participação em minha carreira acadêmica.

Aos alunos e colegas do curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, que dividiram o mesmo espaço físico e conhecimento, em muitas horas de inúmeras disciplinas e seminários. A todos que, de alguma forma, contribuíram em minha formação acadêmica e na construção do conhecimento ao longo destes dois anos.

Ao Viveiro Flora do Vale, por disponibilizar as mudas, e ao Eng. Agrônomo Márcio Franchetti, por ser tão solícito no atendimento e esclarecimento de quaisquer dúvidas.

A todos os amigos, que, de longe ou de perto, prestaram auxílio ou sentimentos de total apoio durante minhas escolhas e decisões ao longo da vida, pelo convívio e amizade em todas as horas.

Às agências de fomento à educação e pesquisa CAPES e REUNI, pela bolsa auxílio concedida durante a realização deste trabalho; cuja verba, fruto do redirecionamento de impostos, que não são poucos, pagos bravamente por cidadãos brasileiros, espero poder retornar-lhes, algum dia, em forma de serviços prestados, para o crescimento e fortalecimento da agricultura brasileira;

A fim de não tornar este documento demasiadamente prolixo, gostaria de brevemente enaltecer, aqueles que por um acaso tenham caído no esquecimento, não que este seja um pretexto, ou subterfúgio válido pela falta de cortesia ao cometer este ato falho da ausência do prenome de algum indivíduo a quem também devo gratidão. Dessa forma adianto minhas sinceras desculpas pelo descuido, e deixo meus sinceros e auspiciosos votos de eterna gratidão a todos que somaram nesta caminhada da vida que já completa 27 anos.

Agradeço finalmente, ao admirável leitor que chegou até a presente linha, e à invenção tipográfica de Gutenberg, que propiciou que a presente obra possa ser lida e relida com aguçada pertinácia, quando lhe convir.

RESUMO

A Podridão da base do estipe (PBE) é uma doença que pode se tornar limitante para o cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson), atualmente muito explorada para produção de palmito. No entanto, suas sementes ainda são de qualidade duvidosa. Os objetivos deste trabalho foram: 1) Avaliar a qualidade sanitária de oito lotes comerciais de sementes de pupunheira, provenientes da região de Porto Velho - RO; 2) Avaliar a eficiência de dois métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira: a) método de detecção de patógenos - Blotter test; b) método do papel cartão com meio nutritivo. 3) Avaliar a patogenicidade e agressividade de isolados obtidos de oito lotes de sementes de pupunheira. 4) Avaliar o tratamento químico de dois lotes de sementes de pupunheira para o controle de *Fusarium* spp., onde foram testados os seguintes tratamentos: captana (1,25); clorotalonil + tiofanato metílico (0,3 + 0,75); tiofanato metílico (0,7); captana + tiofanato metílico (1,25 + 0,7); hipoclorito de sódio a 3% i.a. em g/1000g de semente; a) sanidade; b) germinação, vigor; 5) Caracterizar a evolução sintomática da doença PBE em pupunheira inoculadas com *Fusarium* spp.. 6) Desenvolver uma escala descritiva para avaliação da severidade da PBE em mudas de pupunheira inoculada com *Fusarium* spp.. 7) Avaliar a agressividade de isolados de *Fusarium* spp.. 8) Desenvolver metodologia para inoculação de *Fusarium* spp. em mudas de pupunheira. Na tentativa de se desenvolver uma metodologia foram testados quatro métodos diferentes: a) método de injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* spp.; b) inserção de palito de dente infestado com patógeno; c) substituição de disco da casca por disco de meio de cultura com micélio de *Fusarium* spp.; d) imersão de raízes podadas em suspensão de conídios de *Fusarium* spp. Para a inoculação das mudas pupunheira foram utilizadas plantas em três idades: plântulas com quatro; seis e oito meses. Houve grande variação entre os lotes de sementes de pupunheira quanto a suas qualidades fisiológicas e sanitárias. O fungo patogênico *Fusarium* spp. pode ser transmitido por sementes para plântulas causando a doença PBE. A metodologia do papel cartão para detecção de *Fusarium* spp., mostrou-se mais eficaz na recuperação deste patógeno em sementes de pupunheira. O fungicida clorotalonil + tiofanato metílico obteve o controle efetivo do patógeno alvo *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira. As espécies encontradas entre os isolados obtidos em sementes e mudas de pupunheira foram: *F. oxysporum*; *Fusarium solani* (complexo *F. solani*). Em relação à agressividade dos isolados de *Fusarium* spp., observou-se grande variação entre estes. A inoculação de *Fusarium* spp. foi mais eficiente com os métodos de injeção de suspensão de conídios, para mudas mais velhas (seis e oito meses de idade), e a imersão de raízes em suspensão de conídios foi mais adequada para plantas de pupunheira mais novas, com 4 meses de idade. A escala descritiva de notas para PBE em pupunheira permitiu a avaliação da severidade da PBE.

Palavras-chave adicionais: palmito de pupunha; fungo; patógeno.

SANITARY AND PHYSIOLOGICAL QUALITY OF PEACH PALM SEEDS UNDER CHEMICAL TREATMENT AND CHARACTERIZATION OF SYMPTOMS OF BASAL STEM ROTTING CAUSED BY *FUSARIUM* spp.

The Basal Stem Rotting (BSR) of peach palm may become limiting for peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) farming, currently largely exploited for the production of heart of palm. However, its seeds are still of dubious quality. The objectives of this study were: 1) Evaluating the sanitary quality of eight commercial shipments of peach palm seeds from Porto Velho – RO region in Brazil. 2) Evaluating two detection methods of *Fusarium* spp. in peach palm seeds: a) a method for detecting pathogens – Blotter test; b) a paperboard method with nutritious means. 3) Evaluating the pathogenicity and aggressiveness of isolates from peach palm seeds. 4) Evaluating the chemical treatment of two peach palm seed shipments for controlling *Fusarium* spp., in which the following treatments had been tested: Captan – 1.25; Chlorothalonil + Thiophanate Methyl - 0.3 + 0.75; Thiophanate Methyl - 0.7; Captan + Thiophanate Methyl - 1.25 + 0.7; 3% i.a. sodium hypochlorite in g/1000g of seeds, about their effects: a) sanitary effect; b) germination and vigor. 5) Characterizing the symptomatic evolution of BSR in peach palm inoculated with *Fusarium* spp.. 6) Developing a descriptive scale for evaluating BSR severity in peach palm seedlings caused by *Fusarium* spp.. 7) Evaluating the aggressiveness of *Fusarium* spp. isolates. 8) Developing a methodology for inoculating *Fusarium* spp. in peach palm seedlings. Attempting to develop a methodology, four different methods were tested: a) a method for injecting a conidia suspension of *Fusarium* spp.; b) insertion of pathogen infested toothpicks; c) substitution of the bark for culture disk with *Fusarium* spp. mycelium; d) immersion of pruned root in a conidia suspension of *Fusarium* spp. In order to inoculate peach palm seedlings, plants of three ages were used: 4; 6 and 8-month-old seedlings. There was great variation among peach palm seed shipments on their physiologic and sanitary qualities. The *Fusarium* spp. pathogenic fungus may be transmitted by seeds to seedlings causing BSR disease. The paperboard methodology for *Fusarium* spp. detection proved to be more efficient for recovering this pathogen in peach palm seeds. The Chlorothalonil + Thiophanate Methyl fungicide achieved the effective control over the target pathogen *Fusarium* spp. in peach palm seeds. The species found among the achieved isolates in peach palm seeds and seedlings were: *F. oxysporum*; *Fusarium solani* (*F. solani* complex). Regarding to the aggressiveness of *Fusarium* spp. isolates, a great variation among them was observed, the inoculation of *Fusarium* spp. was more efficient with the methods of suspension injection, for older seedlings (six and eight months of age), and root immersion in conidia suspension were more suitable for younger peach palm plants, such as 4 months old. The descriptive scale of grades for BSR allowed the evaluation of the BSR severity.

Additional keywords: pejobaye palm heart; fungi; pathogen.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. A: Plantas de pupunheira exibindo sintomas internos e externos da Podridão da Base do Estipe (PBE) causada por *Fusarium* spp.; A: pupunheira com aproximadamente dois anos de idade em plantio comercial com sintoma típico da doença - folha bandeira amarelecida; B: muda de pupunheira com 12 meses de idade com folha bandeira e segunda folha amarelecidas; C: corte transversal do estipe em planta de pupunheira evidenciando início do escurecimento do tecido e podridão interna; D: corte transversal do estipe em muda de pupunheira infectada apresentando necrose e apodrecimento dos tecidos internos em estágio avançado da doença.....25

FIGURA 2. Germinação em semente de palmeira do tipo adjacente. Fonte: (MEEROW, 1991).....30

FIGURA 3. Aspecto geral das sementes de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson). I: poros estéreis; II: poro com embrião.....30

CAPÍTULO I - QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA, MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Fusarium* spp. E TRATAMENTO QUÍMICO DE SEMENTES DE PUPUNHEIRA.

FIGURA 1. A e B: Método de detecção de fungos Blotter-test; C: Caldo nutritivo para método do Papel cartão; D: Método do Papel cartão; E, F,G: Disposição dos tratamentos para as duas metodologias de detecção de fungos em sala climatizada (20 °C) e fotofase de 12h.....42

FIGURA 2 . Germinação de sementes de pupunheira: estádios das plântulas de pupunheira: A: Sementes não intumescidas; B I: Emissão do pecíolo cotiledonar; C II: Botão germinativo; D III: Lígula; E IV: Primeira bainha, V: primórdios radiculares; F VI: segunda bainha, VII: primeira bainha, VIII: radícula.....45

FIGURA 3. Preparação do canteiro para teste de emergência e estruturas iniciais das plântulas emergidas. A: Canteiro com substrato areia; B: parcelas divididas e sinalizadas; C: plúmula (seta); D: primeira bainha (seta I); segunda bainha (seta II).....45

FIGURA 4. Obtenção de isolados de *Fusarium* spp. A: Semente de pupunheira com micélio de *Fusarium* spp.; B: colônias de *Fusarium* spp.; C: Suspensão de conídios de três isolados.....50

- FIGURA 5.** Incidência de fungos detectados em oito lotes comerciais de sementes de pupunheira oriundas da região de Porto Velho - RO.....54
- FIGURA 6.** Incidência de *Fusarium* spp. e outros fungos em oito lotes comerciais de sementes de pupunheira oriundas da região de Porto Velho - RO. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5%.....54
- FIGURA 7.** Métodos de detecção de fungos em sementes de pupunheira: Blotter test (A - instalação e C - na avaliação após sete dias de incubação) e Papel cartão (B - instalação e D - na avaliação após 14 dias de incubação).....55
- FIGURA 8.** Teste de sanidade em sementes de pupunheira: A: sementes contaminadas com diversos fungos em método de detecção Blotter test; B e C: sementes de pupunheira com crescimento micelial de *Fusarium* spp. em Papel cartão; D: semente de pupunheira sadia em papel cartão.....56
- FIGURA 9.** Plântulas emergidas em teste de transmissão. A e B: plântulas aos 100 dias após semeadura das sementes: A: lote 02E; B: lote VR1; C: Plântulas com sintomas da PBE e micélio de *Fusarium* spp. na região do colo; D: Detalhe do crescimento de micélio do fungo *Fusarium* spp.....59
- FIGURA 10.** Plântulas de pupunheira do teste de transmissão. A: Plântula com cerca de 90 dias pós-semeadura, exibindo sintomas da doença Podridão da base do estipe; B: corte transversal no colo da plântula sintomática exibindo danos internos (setas); C: corte transversal no colo de uma plântula sadia (setas); D: plântulas sintomáticas com cerca de 120 dias após semeaduras; E: plântulas ainda no substrato exibindo sintomas e sinais da doença (seta).....60
- FIGURA 11.** Severidade da podridão da base (PBE) do estipe em relação ao número de dias após inoculação de três isolados de *Fusarium* spp.; ¹ baseada na escala descritiva com notas (1 a 4) para a severidade da PBE.....69
- FIGURA 12.** Sementes de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) para os seguintes tratamentos: A: Hipoclorito de sódio a 3%; B: Testemunha; C: Captana; D: Captana + Tiofanato metílico; E: Clorotalonil + tiofanato metílico; F: Tiofanato metílico.....72

FIGURA 13. Presença de *Schizophyllum commune* Fr. em sementes de pupunheira. A, B: lote 02E tratado com captana; C, D: 02E tratado com hipoclorito de sódio; E,F: lote VR1 tratado com tiofanato metílico.....73

CAPÍTULO II - MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp.

FIGURA 1. Plantas de pupunheira em diferentes estádios fenológicos. A: Plântulas com 4 meses de idade; B: Mudanças com 6 meses de idade; C: Mudanças com 8 meses de idade.....91

FIGURA 2. Muda de pupunheira com sintomas da PBE **B:** sinais do patógeno, detalhe do crescimento micelial abundante de *Fusarium* spp. na base da planta e no substrato (setas).....91

FIGURA 3. Método de injeção de suspensão de conídios. A: Desinfestação superficial da região de inoculação com álcool 70% ; B: injeção de suspensão conídios no colo da planta com agulha e seringa.....93

FIGURA 4. Metodologia de inoculação por palito. A: palitos esterilizados; B: Palitos dispostos na placa contendo meio de cultura e fragmento de micélio do fungo antes da incubação do material; C: placa colonizada após incubação do material; D: retirada do palito da placa; E: Palito infestado com micélio do fungo; F: introdução do palito de dente infestado com micélio de *Fusarium* spp. no colo da planta.....94

FIGURA 5. Inoculação com substituição de disco da casca por disco de meio de cultura com micélio de *Fusarium* spp. A: Furador com 7 mm de diâmetro; B: placa de Petri colonizada com *Fusarium* spp. utilizada para retirada de discos de meio contendo micélio fúngico; C: Disco de meio com sua face contendo micélio inserido na parte interna do orifício aberto com auxílio do furador; D: ponto de inoculação vedado com filme plástico.....95

FIGURA 6. Plantas de pupunheira utilizadas na metodologia de imersão de raízes podadas em suspensão de conídios. A: plântulas de pupunheira com 4 meses de idade e raiz nua podada; B: mudas de pupunheira com 8 meses de idade, destorroadas e com raízes podadas.....96

- FIGURA 7.** Procedimentos para o preparo da suspensão de conídios de *Fusarium* spp.. A: adição de 5mL de água destilada esterilizada com auxílio de uma pipeta; B: realização do raspagem na placa com auxílio de uma alça de Drigalsky; C: suspensão vertida em béquer; D: câmara de Neubauer utilizada na contagem de conídios; E: câmara de Neubauer vista em microscópio óptico para contagem de conídios/mL; F: ajuste da concentração para padronização da suspensão de conídios de *Fusarium* spp a ser utilizada na inoculação.....97
- FIGURA 8.** Representação gráfica de muda de pupunheira com setas sinalizando os respectivos locais de cada ponto de injeção.....99
- FIGURA 9.** Representação gráfica do material vegetal em duas idades: plântula de pupunheira com 4 meses de idade (A); muda de pupunheira com 8 meses de idade (B).....101
- FIGURA 10.** Vista de nível horizontal das plantas de pupunheira com 6 meses de idade aos 42 após inoculação por meio da metodologia de injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* sp.. A: Um ponto de injeção ; B: Dois pontos de injeção.....110
- FIGURA 11.** Corte transversal aos 7 dias após inoculação. A: Um ponto de injeção ; B: Um ponto de injeção testemunha; C: dois pontos de injeção; D: dois pontos de injeção testemunha.....110
- FIGURA 12.** Corte transversal realizado no colo da planta das mudas de pupunheiras inoculadas com injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* sp. aos 14 dias com: um ponto de injeção (A); dois pontos de injeção (B).....111
- FIGURA 13.** Corte transversal realizado no colo da planta das mudas de pupunheiras aos 42 dias após inoculação com injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* sp. com: dois pontos de injeção; B: dois pontos de injeção testemunha; C: um ponto de injeção; D: dois pontos de injeção testemunha.....112
- FIGURA 14.** Mudanças com 6 meses de idade submetidas a inoculação por injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* sp. com dois pontos aos 21 dias: detalhes do início do amarelecimento das folhas sempre iniciado pela folha bandeira e as demais a seguir da ponta da folha para o centro. A: vista geral do tratamento; B: plantas com sintomas, notas 1 e 2 respectivamente; C: planta com folha bandeira amarelecida -

nota 1; D: Folhas um e dois amarelecidas, nota 2; E: Folha bandeira já amarelecida e início do amarelecimento da folha dois.....113

FIGURA 14. Plântulas de pupunheira com aproximadamente 4 meses de idade, 80 dias após a inoculação por imersão de raízes podadas em suspensão de conídios de *Fusarium* sp. na concentração de $3,25 \times 10^6$ conídios/mL⁻¹. Plantas do tratamento: testemunha (A e B); Plantas inoculadas com os isolados de *Fusarium* sp.: 3A (C); SP3 (D); 1A (E); e SP5.....116

FIGURA 15. Plântulas de pupunheira com aproximadamente 4 meses de idade, 80 dias após a inoculação por imersão de raízes podadas em suspensão de conídios de *Fusarium* sp. na concentração de $3,25 \times 10^6$ conídios/mL⁻¹. Plantas do tratamento: testemunha (A e B); Plantas inoculadas com os isolados de *Fusarium* sp.: 3A (C); SP3 (D); 1A (E); e SP5.....118

FIGURA 16. Plantas inoculadas por injeção com o isolado SAF2 - 21 dias após inoculação.....119

FIGURA 17. Plantas inoculadas por injeção com isolado SP3 - 56 dias após inoculação.....119

FIGURA 18. Plantas inoculadas por palito com o isolado SAF2 - 56 dias após inoculação.....119

FIGURA 19. Detalhe da folha bandeira seca na planta inoculada por injeção com o isolado SP5 35 dias após inoculação.....119

FIGURA 20. Plântulas de pupunheira em diferentes níveis do progresso da doença conforme escala descritiva de notas da PBE. A: Plântulas com nota 4 (seta I) e nota 3 (seta II); B: plântulas com nota 2 (seta I) e nota (seta II).....121

FIGURA 21. Escala descritiva para avaliação da severidade da Podridão da base do estipe, em mudas de pupunheira.....122

FIGURA 22. Corte transversal de mudas de pupunheira com 8 meses de idade. A: Planta sadia não inoculada; B: Planta testemunha na metodologia de injeção, sete dias após injeção de água.....123

FIGURA 23. Corte transversal do estipe de mudas de pupunheira com 8 meses de idade inoculadas com <i>Fusarium</i> sp. por meio da metodologia de injeção de suspensão de conídios apresentando sintomas da PBE. A: sete dias após inoculação; B: 14 dias após inoculação.....	123
FIGURA 24. Corte transversal do estipe de mudas de pupunheira com 8 meses de idade inoculadas com <i>Fusarium</i> sp. por meio da metodologia de injeção de suspensão de conídios apresentando sintomas da PBE. A: 21 dias após inoculação; B: 28 dias após inoculação.....	124
FIGURA 25. Corte transversal do estipe de mudas de pupunheira com 8 meses de idade inoculadas com <i>Fusarium</i> sp. por meio da metodologia de injeção de suspensão de conídios apresentando sintomas da PBE. A: 35 dias após inoculação; B: 42 dias após inoculação.....	124
FIGURA 26. Escala descritiva para avaliação da PBE em plântula de pupunheira.....	125

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - QUALIDADE SANITÁRIA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE PUPUNHEIRA SUBMETIDAS A MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Fusarium* spp. E AO TRATAMENTO QUÍMICO.

TABELA 1. Isolados de <i>Fusarium</i> spp. utilizados nos ensaios, origens e procedências.....	50
TABELA 2. Especificações dos fungicidas utilizados: nome comum, nome comercial e produto comercial (p.c.) por 1kg de sementes.....	52
TABELA 3. Incidência média de <i>Fusarium</i> spp. e outros fungos* em oito lotes comerciais de sementes de pupunheira oriundas da região de Porto Velho - RO, submetidas a dois métodos de detecção de fungos.....	54

TABELA 4. Dados referentes ao número de sementes infestadas com <i>Fusarium</i> spp. e outros fungos em oito lotes avaliados com as metodologias de Blotter test e Papel cartão.....	58
TABELA 5. Incidência média de <i>Fusarium</i> spp. e outros fungos detectados nas metodologias de detecção por Papel cartão e Blotter test.....	59
TABELA 6 . Incidência de <i>Fusarium</i> spp. em sementes e plântulas de pupunheira submetidas ao teste de transmissão em substrato vermiculita. Taxa de transmissão do patógeno em plântulas e incidência de emergência dos oito lotes de sementes.....	60
TABELA 7. Médias dos teores de umidade em oito lotes comerciais de sementes de pupunheira oriundos da região de Porto Velho - RO.....	62
TABELA 8. Médias de percentagem de sementes germinadas, duras e mortas, plântulas normais e anormais (%)......	63
TABELA 9. Médias de percentagem de plântulas emergidas, normais e anormais, sementes duras e mortas (%)......	65
TABELA 10. Médias do IVG e VG de os oito lotes comerciais de sementes de pupunheira.....	67
TABELA 11. Médias de IVE e VE de oito lotes comerciais de sementes de pupunheira.....	68
TABELA 12. Comparação das médias de incidência (%) e severidade da Podridão da Base do Estipe em mudas de pupunheira inoculadas com isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	69
TABELA 13. Isolados de <i>Fusarium</i> spp. utilizados nos ensaios, espécies e procedências.....	70
TABELA 14. Médias de incidência de <i>Fusarium</i> spp. para os seis tratamentos em que foram submetidas as sementes de pupunheira dos lotes 02E e VR1.....	71
TABELA 15. Médias de incidência de <i>Fusarium</i> spp. nos dois lotes (02E e VR1) de sementes de pupunheira submetidos ao teste de sanidade - Blotter test, após seis tratamentos.....	72

TABELA 16. Médias de incidência de <i>Fusarium</i> spp. e outros fungos em dois lotes (02E e VR1) de sementes de pupunheira submetidas à seis tratamentos, porcentagem de controle em relação a testemunha sem tratamento químico.....	72
---	----

TABELA 17. Médias de incidência de outros fungos para os seis tratamentos em que foram submetidas as sementes de pupunheira dos lotes 02E e VR1.....	73
---	----

TABELA 18. Incidência média de outros fungos nos dois lotes de sementes de pupunheira.....	74
---	----

TABELA 19. Comparação de médias de incidência do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) em sementes de pupunheira nos dois lotes tratados.....	77
---	----

TABELA 20. Incidência de sementes de pupunheira germinadas para os seis tratamentos nos dois lotes de sementes.....	77
--	----

TABELA 21. Índice de Velocidade de germinação (IVG) e Velocidade de Germinação (VG) para os seis tratamentos nos dois lotes de sementes de pupunheira.....	77
---	----

CAPÍTULO II - MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. EM PUPUNHEIRA.

TABELA 1. Procedência e origem dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. utilizados nos ensaios.....	106
--	-----

TABELA 2. Médias de incidência e severidade das plantas de pupunheira inoculadas com 20 isolados de <i>Fusarium</i> spp. por meio de duas metodologias de inoculação do fungo.....	112
---	-----

TABELA 3. Médias de incidência e severidade das plantas de pupunheira inoculadas com <i>Fusarium</i> spp. por meio das metodologias de inoculação de injeção de suspensão de conídios e palito infestado com micélio do fungo.....	112
---	-----

TABELA 4. (%) de plantas de pupunheira com sintomas da PBE 90 dias após inoculação com <i>Fusarium</i> spp. com o uso de três metodologias de inoculação.....	116
--	-----

TABELA 5. Médias de incidência de plantas inoculadas com <i>Fusarium</i> spp. por meio de três metodologias de inoculação diferentes, com sintomas da PBE.....	116
TABELA 6. Médias de incidência e severidade de mudas de pupunheira inoculadas pela metodologia de injeção de suspensão de conídios de <i>Fusarium</i> sp. no colo da planta de um a quatro pontos pontos de incisão com agulha e seringa.....	117
TABELA 7. Comparação das médias de incidência e severidade dos tratamentos.....	119
TABELA 8. Médias de incidência e severidade obtidas nas plantas de pupunheira inoculadas por imersão de raízes em três intervalos de tempo diferentes, em suspensão de conídios de dois isolados de <i>Fusarium</i> sp.....	119
TABELA 9. Médias de incidência e severidade da PBE em mudas de pupunheira inoculadas com <i>Fusarium</i> sp. por meio de quatro metodologias de inoculação.....	120
TABELA 10. Comparação das médias de incidência dos tratamentos um e dois pontos de injeção de suspensão de conídios de isolado de <i>Fusarium</i> spp em mudas de pupunheira.....	121
TABELA 11. Médias da incidência de plantas sintomáticas inoculadas com <i>Fusarium</i> sp. e testemunhas injuriadas em duas idades de plantas avaliadas: plântulas com 4 meses de idade e mudas com 8 meses de idade.....	125
TABELA 12. Médias de incidência para plantas sintomáticas para o fator suspensão.....	126
TABELA 13. Comparação de médias da incidência de plantas sintomáticas no estudo de concentração para as metodologias de inoculação por imersão e injeção.....	126
TABELA 14. Médias de incidência e severidade dois cinco isolados de <i>Fusarium</i> spp. patogênicos inoculados em plantulas de pupunheira por meio de metodologia de imersão de raízes podadas em suspensão de conídios do patógeno.....	127
TABELA 15. Isolados de <i>Fusarium</i> spp. utilizados nos ensaios, suas espécies e local de origem.....	127

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS.....	13
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Podridão da base do Estipe (PBE)	23
2.2 Métodos de Inoculação.....	25
2.3 Sementes de Pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth).....	26
3. REFERÊNCIAS	30

CAPÍTULO I - QUALIDADE SANITÁRIA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE PUPUNHEIRA SUBMETIDAS A MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Fusarium* spp. E AO TRATAMENTO QUÍMICO.

1. RESUMO	36
2. ABSTRACT	37
3. INTRODUÇÃO	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Qualidade sanitária de sementes de pupunheira.....	40
4.11 Métodos de detecção de <i>Fusarium</i> spp. em sementes de pupunheira	40
4.12 Transmissão de <i>Fusarium</i> spp. das sementes às plântulas	43
4.2 Qualidade fisiológica das sementes de pupunheira.....	44
4.21 Teor de água.....	44
4.22 Germinação	43
4.23 Emergência.....	47
4.24 Vigor	48
4.3 Patogenicidade e agressividade de isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos a partir de sementes de pupunheira.....	50
4.4 Tratamento químico de sementes de pupunheira para o controle de <i>Fusarium</i> spp.....	52
4.41 Sanidade de sementes.....	53
4.42 Germinação e vigor	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55

6. CONCLUSÕES.....	80
7. REFERÊNCIAS	81
CAPÍTULO II - MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE FUSARIUM.	
1. RESUMO	89
2. ABSTRACT	90
3. INTRODUÇÃO	91
4. MATERIAL E MÉTODOS	92
4.1 Preparo do inóculo e isolamento de <i>Fusarium</i> spp.....	92
4.2 Métodos de inoculação.....	94
2.1 Injeção de suspensão de conídios.....	94
2.2 Inserção de palito de dente infestado com micélio do fungo.....	94
2.3 Substituição de disco da casca por disco de micélio.....	94
2.4 Imersão de raízes podadas em suspensão de conídios.....	94
4.3 Caracterização da evolução sintomatológica da PBE em pupunheira.....	94
4.4 Escala descritiva para avaliação da severidade da podridão do estipe (PBE)	100
4.5 Agressividade de 20 isolados de <i>Fusarium</i> spp. utilizando dois métodos de inoculação	101
4.6 Desenvolvimento de métodos de inoculação de <i>Fusarium</i> spp. em pupunheira.....	101
4.7 Patogenicidade de isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	105
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
6. CONCLUSÕES	129
7. REFERÊNCIAS	130

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) é uma planta nativa da região tropical das Américas (BOVI, 1998). No território brasileiro ocorre em toda a bacia Amazônica, compreendendo os estados do Acre, Amazonas, Pará, Maranhão, Amapá, Roraima, Rondônia e norte do Mato Grosso (KULCHETSCHI e GARDINGO, 2001).

Através do cultivo desta palmeira para produção de palmito, esta espécie poderá exercer um papel preponderante na solução do problema de oferta de matéria-prima no Brasil. O palmito ou “heart of palm”, como é conhecido internacionalmente, é um produto de alto valor nos mercados interno e externo, movimentando aproximadamente 350 milhões de dólares por ano, com geração de 8 mil empregos diretos e 25 mil indiretos (BOVI, 2000).

A exploração de pupunheira para produção de palmito é uma atividade recente, as pesquisas nesta área iniciaram no ano de 1965 com o Centro Agronômico Tropical de Investigação e Ensino - CATIE, em Turrialba, Costa Rica (YUYAMA e MESQUITA, 2000). Segundo Mora-Urpí et al., (1997), a primeira plantação na Costa Rica, foi feita em 1974. No Brasil, os primeiros resultados de pesquisa começaram a ser divulgados a partir de 1978 (BOVI, 1998). Estima-se que foram plantados até o ano 2008 cerca de 60 mil ha, principalmente nos estados do Acre, Espírito Santo, Bahia, São Paulo e Pará (BOVI, 1998; BOVI, 2000 ; SANTOS, et al., 2008).

A pupunheira vem despertando acentuado interesse por parte dos agricultores devido as suas múltiplas possibilidades de utilização. No interior da Amazônia, a pupunheira constitui-se em uma valiosa e versátil planta de subsistência. Dela pode-se obter frutos para consumo direto (após cozimento em água e sal), para fabrico de farinha de utilização humana ou animal, óleo, além do palmito, que é de excelente qualidade (CLEMENT e MORA-URPI, 1987).

Segundo Rodrigues e Durigan (2007), a exploração do palmito no Brasil está deixando de ser uma atividade extrativista e clandestina para ser considerada agrícola devido ao plantio de areáceas destinadas à produção de palmito, a exemplo da pupunheira e palmeira real. Nessas condições houve uma significativa redução da exploração de palmeiras nativas da Mata Atlântica evitando a degradação de remanescentes de mata e preservando o meio ambiente. Em razão da precocidade e do rendimento, a pupunheira despertou o interesse de produtores e agroindústrias sendo selecionada como a principal areácea destinada à produção de palmito no Brasil, apresentando-se como alternativa de produção economicamente viável e sustentável.

A principal característica da pupunheira que interessa para a produção de palmito é o perfilhamento, pois o corte contínuo de palmito vai se basear nessa característica de regeneração permanente, diferentemente da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius), que morre ao ser cortada, a pupunheira permite vários cortes e possui crescimento mais rápido. A espécie também tem apresentado ampla adaptação geográfica, além de não sofrer escurecimento (oxidação) após o corte do palmito (TONET et al., 1999)

Desde o ano 2000 é verificada a ocorrência da doença Podridão da Base do Estipe (PBE) em plantios de pupunheiras ocasionados por *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* (SANTOS et al., 2004). Os sintomas desta doença na planta são: amarelecimento da folha bandeira (sintoma inicial ou indicador), seguida pela morte da folha bandeira e/ou amarelecimento de folhas externas e, por fim, a morte da planta (SANTOS et al., 2004b).

O fungo *Fusarium* é um microorganismo com extrema importância patogênica para diversas espécies de plantas (BOOTH, 1971). Este gênero é composto de várias espécies que possuem ampla adaptação em diferentes ambientes (BURGESS et al., 1994). Há relatos de várias espécies de *Fusarium* patogênicas à pupunheira: *F. anthophilum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani* e *F. subglutinans* (PIZZINATTO et al., 2001).

Em se tratando de sementes desta palmeira, Bovi (1998) considera que mais de 90% do material utilizado é proveniente do Peru, sendo que geralmente não recebem tratamento para controle fitossanitário. Além disso, Bovi (1998b) ainda relata que é verificado problemas durante os processos de germinação e formação de mudas. Estes fatos são provavelmente devidos à ocorrência de patógenos nas sementes (BOVI, 1993; VARGAS e VILLAPLANA, 1979; COATES - BECKFORD e CHUNG, 1987). Dessa forma, pode-se observar que frente a esta ameaça de entrada de patógenos em novas áreas tendo a sementes como fonte de inóculo, faz-se necessário a inspeção e o tratamento desse material propagativo a fim de verificar suas qualidades sanitárias para evitar a disseminação de patógenos (SANTOS et al., 2011).

Diante do exposto, considerando a crescente importância da cultura da pupunheira no Brasil, este trabalho objetiva contribuir para o desenvolvimento de medidas fitossanitárias e metodologias adequadas ao controle de patógenos em *Bactris gasipaes*. Os objetivos específicos do presente trabalho foram: a) Avaliar a qualidade sanitária de oito lotes comerciais de sementes de pupunheira provenientes da região de Porto Velho - RO; b) avaliar métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira; c) avaliar a transmissão de *Fusarium* spp. de sementes para plântulas de pupunheira, assim como a agressividade de isolados obtidos de sementes pupunheira; d) avaliar a eficiência de fungicidas no controle de *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira; e) avaliar a qualidade fisiológica dos oito lotes de sementes de pupunheira; f) caracterizar a evolução sintomática da doença PBE em mudas de pupunheira inoculadas com *Fusarium* spp.; g) desenvolver uma escala descritiva para avaliação da severidade da PBE em mudas de pupunheira ocasionada por *Fusarium* spp.; h) avaliar a agressividade de isolados de *Fusarium* spp.; i) desenvolver e testar metodologias adequadas para a inoculação de *Fusarium* spp. em mudas de pupunheira.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Exploração da pupunheira para a produção de palmito

A exploração de pupunheira para produção de palmito é uma atividade relativamente recente, as pesquisas nesta área iniciaram no ano de 1965, no Centro Agronômico Tropical de Pesquisa e Ensino (CATIE), em Turrialba, Costa Rica (YUYAMA; MESQUITA, 2000). Segundo dados de Mora-Urpi et al. (1997), a primeira plantação, na Costa Rica, foi feita em 1974. Já no Brasil os primeiros resultados de pesquisa de produção de palmito começaram a ser divulgados a partir de 1978 (BOVI, 1998). Nos últimos anos, o cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) para a produção de palmito vem despertando o interesse de agricultores em todo o país, devido principalmente, a busca de novas opções de cultivo em substituição aos tradicionais, em virtude dos baixos preços alcançados por esses no mercado (BOVI, 1998). Segundo Rodrigues e Durigan (2007) a exploração do palmito no Brasil está deixando de ser uma atividade extrativista e clandestina para ser considerada agrícola devido ao plantio de palmáceas destinado à produção de palmito, a exemplo da pupunheira e palmeira real.

Como alternativa viável para a indústria do palmito, surge oportunidade para o desenvolvimento de uma nova espécie a ser explorada de forma consciente. Face ao aumento das restrições legais, criou-se um cenário favorável à expansão do mercado de palmito cultivado, o palmito pupunheira, com palmeiras mais precoces apresentando o primeiro corte (em torno de 18 meses), e a possibilidade de cortes anuais sucessivos com alto número de perfilhos, conferindo-lhe a característica de cultura perene. Além de ampla adaptação geográfica e alto perfilhamento (BOVI 2000); (TONET et al., 1999).

O Brasil é o maior produtor e consumidor de palmito do mundo, porém não detém o título de maior exportador (SOUSA et al., 2009); nos últimos anos, a Costa Rica e o Equador, assumiram a liderança do mercado internacional. A perda da primeira posição no ranking dos maiores exportadores mundiais deve-se ao fato de o palmito nacional apresentar baixa qualidade e ser um produto não ecológico, pois é sustentado pelo corte de palmeiras nativas. A baixa qualidade do palmito é resultado do processo de extrativismo (GUERREIRO, 2002; SAMPAIO et al., 2007)

Para Ferreira *et al.* (1990), a constante e crescente necessidade de suprimento de matéria-prima, para as indústrias no mercado nacional e internacional, tem despertado especial interesse em outros gêneros da família Arecaceae, particularmente os capazes de fornecer palmito de boa qualidade em curto prazo.

Conhecido internacionalmente como “heart of palm”, o palmito é uma iguaria com alto valor agregado, atingindo alto valor nos mercados interno e externo, movimentando aproximadamente 350 milhões de dólares por ano, com geração de 8 mil empregos diretos e cerca de 25 mil indiretos (BOVI, 2000).

O centro de origem da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson), uma palmeira da família Arecaceae, ainda é uma incógnita quanto ao exato local. Segundo Clement (1988), o provável centro de origem do grupo que engloba as espécies selvagens de pupunheira localiza-se no noroeste da América do Sul. Uma destas espécies deu origem à pupunheira cultivada que foi domesticada pelos Ameríndios, povo este que tinha o fruto da pupunheira como o principal alimento para suas comunidades de ameríndios pré-colombianos nas planícies tropicais úmidas, os quais domesticaram a pupunheira e a introduziram em diversas regiões da bacia Amazônica e na região noroeste da porção andina, estendendo-se até porções da América Central (MORA-URPI et al., 1997).

O cultivo da pupunheira se disseminou desde o México até a Bolívia, encontrando no Brasil condições edafo-climáticas favoráveis para sua expansão (BOVI, 1998). No território brasileiro, é nativa em toda a bacia Amazônica, compreendendo os estados do Acre, Amazonas, Pará, Maranhão, Amapá, Roraima, Rondônia e norte do Mato Grosso (BOVI, 1998; KULCHETSCHI; GARDINGO, 2001). Essa planta pode ser cultivada nas mais diversas condições climáticas, porém seu melhor desempenho ocorre em regiões de clima tropical quente e úmido (DEENIK et al., 2000).

A falta da perspectiva de conservacionismo, aliado ao imediatismo econômico pode ter sido o grande vilão no agronegócio do palmito, trazendo como consequência a depredação de nossos recursos naturais. A quase extinção do palmitero (*Euterpe edulis* Mart.), em meados do século XX, foi devida à destruição acelerada da Mata Atlântica, que foi acompanhada pela dizimação das populações do palmitero e a eliminação de condições para sua regeneração, sendo que nessa época cerca de 99 % do palmito comercial brasileiro procede do extrativismo, principalmente do açaí, na região do estuário do Rio Amazonas, e da juçara, na Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste (BOVI, 1998; BOVI, 2000). Apesar da exploração indiscriminada de espécies do gênero *Euterpe*, este gênero atualmente ainda proporciona cerca de 80% do palmito disponível no mercado nacional (BOVI, 2002); porém, esse quadro vem mudando, devido às suas vantagens em relação a outras palmeiras, nos últimos anos o cultivo da pupunheira para a produção de palmito vem despertando o interesse de agricultores de todo país, como nova opção de cultivo (SANTOS et al., 2011).

2.2 Podridão da base do estipe (PBE)

A doença denominada Podridão da Base do Estipe (PBE), vem tornando-se um problema preocupante para a pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson), sendo que a partir do ano 2000, tem-se verificado a ocorrência da doença nos plantios de pupunheira, de onde se tem isolado os patógenos *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler e *Fusarium* spp. (SANTOS et al., 2004a; 2004b), ocorrendo em plantas de pupunheira com diferentes idades (Figura 1), desde viveiro, sendo mais frequente em plantios com idade entre seis a doze meses (SANTOS et al., 2001). Esses patógenos tiveram a sua patogenicidade demonstrada por SANTOS et al. (2004a) e ALVES et al. (2004).

Alves et al (2006) evidenciaram comportamentos diferenciados das plantas e perfilhos componentes das touceiras na evolução dos sintomas da PBE. Às vezes, nas touceiras doentes, observa-se a morte da planta mãe e dos perfilhos, enquanto que, em outras, observa-se apenas a morte da planta-mãe ou somente um amarelecimento da folha bandeira e das folhas externas da copa, não se verificando mais tarde os sintomas nos perfilhos (ALVES et al., 2006).

Há relatos da ocorrência desta doença ocasionada por diversas espécies do gênero *Fusarium* em plantios de pupunheira, e já foram encontradas as espécies *F. subglutinans*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. anthophilum* e *F. oxysporum* (PIZZINATTO et al., 2001). Até 2001, segundo SANTOS et al., 2001 a podridão da base do estipe era encontrada no Paraná apenas da associação pelo agente causal *Fusarium* spp.

Os sintomas da PBE na planta são: amarelecimento da folha bandeira (sintoma inicial ou indicador) (Figura 1), seguida pela morte da folha bandeira e/ou amarelecimento de folhas externas, e por fim, a morte da planta (SANTOS et al., 2004b). Há ainda relato de várias espécies de *Fusarium* causando além de sintomas de amarelecimento de folhas, a necrose do colo das plantas, chegando a causar até a morte das plantas de pupunheira (PIZZINATTO et al. 2001). O autor destaca a morte de plantas de pupunheira, em virtude da ocorrência de *Fusarium* spp., tanto em viveiro como em campo ou casa de vegetação, levando-se em consideração a idade das plantas, uma vez que as plantas jovens são mais suscetíveis do que as plantas mais velhas. A doença ocorre com maior frequência em plantios com idade entre seis e doze meses (SANTOS et al., 2001).



FIGURA 1. A: Plantas de pupunheira exibindo sintomas internos e externos da Podridão da Base do Estipe (PBE) causada por *Fusarium* spp.; A: pupunheira com aproximadamente dois anos de idade em plantio comercial com sintoma típico da doença - folha bandeira amarelecida; B: muda de pupunheira com 12 meses de idade com folha bandeira e segunda folha amarelecidas; C: corte transversal do estipe em planta de pupunheira evidenciando início do escurecimento do tecido e podridão interna; D: corte transversal do estipe em muda de pupunheira infectada apresentando necrose e apodrecimento dos tecidos internos em estágio avançado da doença.

2.3 Métodos de inoculação

Há escassez de trabalhos realizados sobre a inoculação de *Fusarium* spp. em pupunheira. Alves et al., (2006) inocularam mudas de pupunheira com o auxílio de um furador, fazendo um furo circular de 7 mm de diâmetro no caule, na região do colo, em plantas com 10 meses de idade, obtendo sucesso na inoculação de 15 isolados de *Fusarium* spp. nas mesmas.

Este método quando utilizado por Fuzitani (2012), para inocular mudas de pupunheira com *Phytophthora palmivora*, apresentou morte de 15% das plantas do tratamento testemunha. O autor avaliou ainda a metodologia de imersão da extremidade de raízes em suspensão de zoósporos de *P. palmivora* e o de injeção de uma suspensão de zoósporos de *P. palmivora* na base do estipe, sendo este último método considerado o de maior rapidez nos resultados e maior facilidade operacional.

Pizzinatto et al., (2001) inocularam mudas de pupunheira em duas idades (45 e 120 dias) com *Fusarium* spp., ferindo previamente a região do colo da planta com um agulha, e a seguir depositando no substrato próximo ao ponto injuriado, sementes de trigo colonizadas com o fungo. Os resultados evidenciaram que a metodologia é mais eficiente em plantas novas com 45 dias de idade.

Em outros patossistemas, tem sido utilizados diferentes métodos de inoculação, o método de inoculação por palito inoculado utilizado por Verzignassi et al. (2004), já testada anteriormente por Siviero & Menten (1995), faz uso de um palito de dente colonizado com o micélio do fungo a ser espetado no colo da planta, mostrando-se eficiente por apresentar menor custo, maior facilidade e à rapidez em relação aos outros métodos de inoculação.

Em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), Cavalcanti (2002), obteve sucesso quando utilizou o método de inoculação de raízes previamente podadas em suspensão na concentração de 1×10^6 conídios/mL de *Fusarium oxysporum*. Esta metodologia também foi utilizada para inocular *F. oxysporum* f.sp. *cubense* em Helicônia (*Heliconia* spp.) por Castro (2008), e anteriormente já descrita e avaliada por Waite (1953). Geralmente, o método mais utilizado é o “dipping” ou imersão de raízes em suspensão de inóculo do fungo na concentração de 1×10^6 conídios/mL. (CASTRO 2007).

Em estudos relacionados à doença de podridão do colmo do milho causada por *Fusarium moniliforme*, Borges (2001), emprega a metodologia de injeção de conídios, segundo o autor com eficiência comprovada por Hooker, (1957); Pappelis, (1970); Munkvold & Carlton, (1997) entre outros. A inoculação consiste da injeção de volume conhecido da suspensão de conídios no colmo pouco acima do solo, utilizando-se seringas descartáveis.

2.4 Sementes de Pupunheira

Há grande procura por sementes dessa palmeira, sendo que mais de 90% do material plantado é proveniente do Peru. Como normalmente as sementes não recebem tratamento fitossanitário, tem-se verificado problemas durante a germinação e a formação de mudas (BOVI, 1998b) e, posteriormente, no desempenho em campo (BOVI, 1998a).

Dentre os problemas com o fornecimento de sementes de pupunha pode-se citar a falta de bancos (in vitro) de sementes selecionadas para cada destinação que se pretenda dar à cultura, bem como à perda da viabilidade das sementes (ALMEYDA e MARTIN, 1980). Esta última, que parece estar associada com a perda de umidade das sementes, tem obrigado à semeadura imediata, o que nem sempre é possível devido às distâncias entre os locais de obtenção das sementes e os do plantio (FERREIRA e SANTOS, 1992).

O fruto da pupunheira é uma drupa ovóide com aproximadamente 1,0 a 4,0 cm de comprimento e peso entre 2,0 a 4,0 gramas, de coloração vermelha, vermelho-amarronzada, amarela ou laranja, de polpa carnosa, rica em caroteno, feculenta, doce, oleosa, fibrosa e de coloração variando de amarela a laranja, e, ainda, pode-se encontrar frutos albinos (CLEMENT, 1997; BLAAK, 1980). Estes frutos fazem parte da dieta da população amazônica (MORA-URPI, 1983; AGUIAR et al., 1980; LORENZI et al., 1996).

Sabe-se que a colheita é feita durante o período de chuvas de dezembro a março, a fenologia da planta permite em regiões de maior pluviosidade e sem período de estiagem pronunciado, duas florações ao ano, sendo que em uma há maior produção de flores (Mora Urpí & Solís 1980; Beach 1984). Em regiões de menor precipitação e com período de estiagem marcado, a floração ocorre em uma só época (MORA URPI e SOLÍS, 1980).

Em relação à colheita e ao beneficiamento, as sementes de pupunheira são normalmente obtidas quando os frutos estão completamente maduros. Contudo, as maiores taxas de germinação e vigor das sementes são alcançadas, em média, aos 80 dias após a antese, aproximadamente um mês antes da completa maturação dos frutos (FERREIRA, 1996).

As sementes de pupunheira não toleram grandes perdas de umidade, sem que sua viabilidade e vigor sejam reduzidos significativamente, podendo-se enquadrá-las no grupo das espécies chamadas recalcitrantes. A perda de viabilidade parece estar associada com a diminuição de umidade das sementes, obrigando à semeadura imediata, o que nem sempre é possível devido às distâncias entre os locais de obtenção das sementes e os do plantio (FERREIRA e SANTOS, 1992).

O agrupamento inicial proposto por Roberts (1973), separa as sementes em dois grupos, considerando basicamente, a intolerância à dessecação, a curta longevidade e a intolerância às temperaturas baixas de um grupo de sementes, então denominadas recalcitrantes, em contraste com as ortodoxas. O caráter de Recalcitrância confere à semente uma incapacidade de sobreviver ao armazenamento em ambientes relativamente secos. Estas sementes não sofrem

secagem drástica durante a maturação e são sensíveis a injúrias durante a dessecação (ROBERTS, 1973).

O teor de água é um fator determinante do comportamento das sementes recalcitrantes, nessas sementes, a água sub-celular está fortemente associada às superfícies macromoleculares assegurando, em parte, a estabilidade de membranas e macromoléculas. A perda de água estrutural durante o processo de secagem causaria a alteração de sistemas metabólicos e de membranas, resultando no início do processo de deterioração (FARRANT et al., 1988).

Dessa forma, as sementes devem ser semeadas preferencialmente logo após o beneficiamento, pois perdem rapidamente a viabilidade com a redução do grau de umidade. Se for necessário armazená-las, deve-se tomar alguns cuidados para mantê-las viáveis por mais tempo. Sementes armazenadas com elevado teor de umidade são facilmente atacadas por fungos ou podem germinar durante o armazenamento (FERREIRA, 1996).

A perda da viabilidade, de modo geral, ocorre em razão dos efeitos da desidratação das sementes sobre a integridade do embrião. A idade da semente e (ou) as condições predominantes durante seu transporte e armazenamento também podem influenciar a qualidade das sementes e, conseqüentemente, afetar a viabilidade e germinação (MEEROW, 1991).

Em estudos acerca da morfologia de sementes de pupunheira, SILVA et al., 2006 descreve a sequência dos eventos morfológicos da germinação de diásporos empregando as terminologias já descritas por Tomlinson (1961) e Barroso et al. (1999). Os diásporos de pupunheira possuem forma globosa a elipsóide, com endosperma homogêneo, oleaginoso, de consistência dura, ocupando quase todo o espaço interno da semente. Seu embrião é lateral, periférico e relativamente indiferenciado, de forma cônica, com uma das extremidades côncava, no interior da qual se encontra uma pequena protuberância, e a outra extremidade, arredondada e mais afilada.

A semente de pupunheira é envolvida por endocarpo amarronzado ou preto. Portanto a unidade de dispersão (diásporo) é botanicamente um pirênio. O formato do pirênio é muito variável e pode ser obovado, elíptico, arredondado, oblongo, cuneiforme, cônico ou ligeiramente angular (Figura 3). O diásporo possui três poros: dois são estéreis e sob o terceiro encontra-se o embrião (Figura 3), na superfície dorsal do diásporo possui fibras pretas que atravessam longitudinalmente o propágulo e concentram-se ao redor do poro por onde emerge a plântula, formando um tampão fibroso na base do poro germinativo (FERREIRA, 1996).

A germinação das sementes de palmeiras pode ser classificada em dois tipos, conforme o padrão de desenvolvimento das estruturas essenciais da plântula: germinação remota e germinação adjacente (COSTA, C.J.; MARCHI, E.C.S., 2008). Segundo Meerow (1991), a germinação da pupunheira é do tipo adjacente ligulada, como pode ser observado em detalhes na Figura 2, ilustrada por Costa e Marchi 2008, podendo ainda ser considerada criptocotiledonar e hipógea (FERREIRA, 2005). Este conceito é muito bem definido por Tomlinson (1960; 1961), onde relata que a germinação da pupunheira é do tipo adjacente ligulada, pois o

cotilédone não apresenta grande alongamento, ocorrendo o desenvolvimento da plântula adjacente ao diásporo.

A evolução dos estádios de germinação pode ser visto conforme Figura 2, o primeiro estágio é caracterizado pelo alongamento do embrião que resulta na emergência do pecíolo cotiledonar (Figura 2 A), o qual se intumescce formando o botão germinativo (Figura 2 B) (FERREIRA, 1996; MATTOS-SILVA e MORA-URPÍ, 1996).

Meerow (1991, *apud* COSTA; MARCHI, 2008 p.19) considera nas sementes que apresentam germinação adjacente (Figura 2A-C), somente uma pequena porção do cotilédone emerge da semente, que aparece como uma massa de células indiferenciadas na depressão micropilar da semente, conhecida como botão germinativo (Figura 2A). Posteriormente, o botão germinativo torna-se cilíndrico, com a diferenciação dos primórdios caulinares e radiculares, sendo o primeiro envolto por uma bainha fechada (Figura 2C). A raiz primária é comumente diminuta e rapidamente substituída por raízes formadas a partir da base do eixo embrionário (raízes adventícias) (Figura 2C). O haustório permanece na semente, transferindo reservas nutritivas do endosperma para a plântula em desenvolvimento (Figura 2C).

Após a sucessão de todos os estádios relatados anteriormente, o final do período da fase de plântula ocorre quando, de acordo com o conceito de Tomlinson (1990), o consumo das reservas nutritivas da semente de pupunheira pelo haustório e a concomitante produção fotossintética pelo eófilo.

Pizzinatto et al.,(2001) testaram a eficiência de fungicidas para o controle de fungos associados a sementes de pupunheira, objetivando definir produtos que possam ser utilizados no tratamento rotineiro de sementes dessa palmeira, sem apresentar efeitos fitotóxicos, seja na germinação e vigor, seja no crescimento. Utilizando os fungicidas nas respectivas doses de ingrediente ativo em g/100 kg de sementes: thiabendazole (15); difenoconazole (30); thiram - (125); thiabendazole + thiram (15 + 70) e carboxin + thiram (50+50). Com relação ao efeito do tratamento químico das sementes sobre a germinação, verificou-se que os fungicidas thiabendazole e thiabendazole + thiram, afetaram significativamente a germinação das sementes em substrato vermiculita (redução em 18,15 e 17,40%, respectivamente), devido a alguma possível ação fitotóxica. A avaliação conjunta do índice de sanidade e vigor das sementes, indicaram que o fungicida thiram foi o que proporcionou o melhor tratamento químico de sementes de pupunheira. A germinação média dos tratamentos ficou entre 55 e 67 %, e índice de velocidade e germinação entre 1,26 a 0,95.

Ferreira e Santos(1992), em testes de emergência com sementes de pupunheira em substrato serragem parcialmente decomposta, obtiveram início entre 50 e 60 dias após a semeadura, alcançado sua estabilização entre 120 e 130 dias. Concordando com resultados de Cardoso (1944) que observou um período de 100 a 150 dias para a semeadura em terra, enquanto em serragem este período baixou para 50 a 80 dias

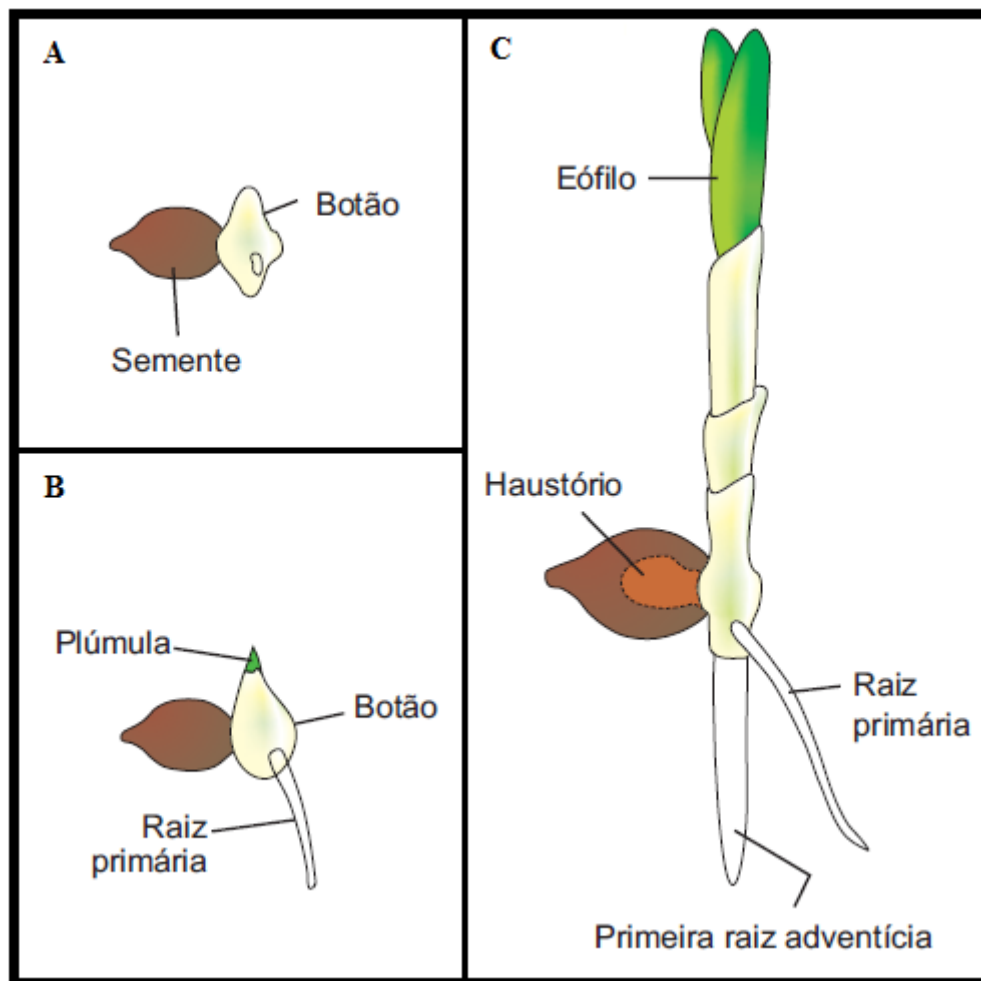


FIGURA 2. Germinação em semente de palmeira do tipo adjacente. **Fonte:** (MEEROW, 1991)



FIGURA 3. Aspecto geral das sementes de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson). **I:** poros estéreis; **II:** poro com embrião.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J.P.L.; MARINHO, H.A.; REBÊLO, Y.S.; SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica, Manaus**, v. 10, n. 4, p. 755-758, 1980.
- ALMEYDA, N.; MARTINS, F. W. - 1980. The pejipaye. In: **Cultivation of neglected tropical fruits with promise**. USDA, pt. 8. 10p.
- ALVES, S. A. R.; SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J. Análise da patogenicidade de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* à pupunheira. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 3., 2004, Colombo. **Anais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 1 CD-ROM. (Embrapa Florestas. Documentos, 102).
- ALVES, S. A. R.; SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. **Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* associados com a podridão do estipe da pupunheira no Paraná**. Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n. 52, p. 133-140, jan./jun. 2006.
- BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. **Frutos e Sementes: Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa-MG: Editora UFV. 1999. 443p.
- BLAAK, G., 1980: **Vegetative propagation of pejibaye** (*Bactris gasipaes* H.B.K.). Turrialba (Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas, Costa Rica) Vol. 30, No. 3 pp. 258-261.
- BEACH, J. H. 1984. The reproductive biology of the peach or "pejibaye" palm (*Bactris gasipaes*) and a wild congener (*B.porschiana*) in the Atlantic lowlands of Costa Rica. **Principes**. 28(3):107-119.
- BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V.; VON PINHO, R. G. Inoculação artificial de colmos de milho em diferentes idades e concentrações de inóculo e sua relação com a expressão da resistência a *Fusarium moniliforme*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 715-720, 2001.
- BOOTH, C. The genus *Fusarium*. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237p.
- BOVI, M.L.A.; FLORES, W.B.C.; SPIERING, S.H.; MARTINS, A.L.M.; PIZZINATTO, M.A.; LOURENÇÃO, A.L. Seed germination of progenies of *Bactris gasipaes*: percentage, speed and duration. **Acta Horticulture**, Wageningen, v. 360, p. 157-165, 1993.

BOVI, M.L.A. Palmito - pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). In: FAHL, J.I. et al. (Eds.). **Instruções Agrícolas para as Principais Culturas Econômicas**. 6a. ed. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998a. p 269-271.

BOVI, M.L.A. 1998b. **Palmito pupunha: informações básicas para cultivo**. Instituto Agrônomo, Campinas, 1998b. 50 p. (Boletim técnico, 173).

BOVI, M. L. A. O Agronegócio Palmito de Pupunha. **O Agrônomo**, Campinas, v. 52, n. 1, p. 10-12, 2000.

BOVI, M.L.A.; GODOY JUNIOR, G.; SPIERING, S.H. Respostas de crescimento da pupunheira à adubação NPK. **Scientia Agrícola**, v.59, n.1, p.161-166, 2002.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S. GOTT, K.P. & BACKHOUSE, D. **Laboratory manual for Fusarium research**, Sydney, University of Sydney.1994.

CASTRO, N. R. **Murcha de *Fusarium* em *Heliconia* spp.: ocorrência, variabilidade e resistência genética em espécies ornamentais cultivadas em Pernambuco, Alagoas e Sergipe**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2007. 87 p.

CASTRO, N. R. *et al.* Ocorrência, métodos de inoculação e agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense em *Heliconia* spp. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 02, p. 127-130, 2008.

CAVALCANTI, L.S.; COELHO, R.S.B.; PEREZ, J.O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**. V.32, p.1-5. 2002.

COATES-BECKFORD, P. L.; CHUNG, P. C. 1987. A study of the germination, disease symptoms and fungi associated with pejibaye seeds. **Seed Science & Technology**. p. 205-218.

CLEMENT, C.R.; MORA-URPÍ, J. 1987. Pejibaye palm (*Bactris gasipaes*, Arecaceae): Multi-use potential for the lowland humid tropics. **Economic Botany**, vol.41 n.2: p. 302-311.

CLEMENT, C.R.; ARADHYA, M. K.; MANSHARDT, R. M. 1997. Allozyme Variation In spineless pejibaye (*Bactris gasipaes* Palmae). **Econ. Bot.** Vol.51, No 2 pp. 149 - 157.

DEENIK, J.; ARES, A.; YOST, R.S. Fertilization response and nutrient diagnosis in peach palm (*Bactris gasipaes*): A review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.56, n.3, p.195-207, 2000.

FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Recalcitrance – a current assessment. **Seed Science and Technology**, v.16, n.1, p.155-166, 1988.

FERREIRA, V.L.P.; Bovi, M.L.A., Carvalho, C.R.L. et al. 1990. **Composição química e curvas de titulação de acidez do palmito de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) de diversas localidades**. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas. v.20, p. 96-104.

FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. 1992. Viabilidade de sementes de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth.). **Acta Amazônica**, 22(3): 303-307.

FERREIRA, S.A.N. **Maturação fisiológica de sementes de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth)**. Tese de doutorado. INPA/UA. Manaus, Brasil. 73p. 1996.

FERREIRA, S.A.N. 2005. **Pupunheira, *Bactris gasipaes* Kunth**. In: Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C. (Eds) Manual de Sementes da Amazônia. Fascículo 5, 12p. INPA, Manaus, AM, Brasil.

FUZITANI, E. J. **Integração de medidas de manejo da podridão da base de estipe em mudas de pupunheira**. UFPR, Curitiba, Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), 63 p. 2012

GUERREIRO, L. F. Palmito de Pupunha. **Desenbahia**: Agência de Fomento do Estado da Bahia, Bahia, v. 01/02, 2002. 14 p.

KULCHETSCKI, L.; GARDINGO, J. R. **Aspectos ecológicos, botânicos e morfológicos**. In: KULCHETSCKI, L.; CAHIMSOHN, F. P.; GARDINGO, J. R. Palmito Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), Ponta Grossa, UEPG, p.148, 2001.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; MEDEIROS-COSTA, J.T.; CERQUEIRA, L.S.C.; VON BEHR, N. Palmeiras no Brasil: exóticas e nativas. Nova Odessa: **Plantarum**, 1996. 303 p.

MATTOS SILVA, L. A.; MORA URPI, J. 1996. Descripción morfológica general del pejibaye cultivado [*Bactris (Guilielma) gasipaes* Kunth Arecaceae]. **Boletín Informativo: Serie Técnica**

Pejibaye (Guilielma). 5(1):34-37.

MEEROW, A.W. 1991. Palm seed germination. *IFAS Cooperative Extension Bulletin*, 274:1-10.

MORA URPI, J.; SOLÍS, E. M. 1980. Polinización en *Bactris gasipaes* H .B.K. (Palmae) . **Revista Biología Tropical**. 28(1):153-174.

MORA-URPI, j. El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K): origem, biologia floral y manejo agronômico: In: **WORKSHOP ON UNDER UTILIZED PALMS TROPICAL AMERICA**, 43., 1983. Proceedings. p. 118-160.

MORA Urpi, J.; WEBER; J.C.; CLEMENT, C.R. 1997. Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth {Pupunheira}. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 20. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research - IPK, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute - **IPGRI**, Rome. 83p.

PIZZINATTO, M. A.; BOVI, M. L. A.; SPIERING, S. H.; BINOTTI, C. S. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a planta de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, n.263-268, 2001.

ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology** 1:499-514.

RODRIGUES, A. S.; DURIGAN, M. E. O Agronegócio do palmito no Brasil – Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2007. **Circular Técnica**, 130.

SAMPAIO, L. C.; NETO, S. N. O.; LELES, P. S. S.; SILVA, J. A.; VILLA E. B. Análise técnica e econômica da produção de palmito de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth.) e de palmeira real (*Archontophoenix alexandrae* Wendl. & Drude). **Revista Floresta e Ambiente**. v. 14, n. 1, 2007.

SANTOS, A. F dos; TESMANN, D. J.; VIDA, J. B.; NUNES, W. M. C. As doenças da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth): Antracnose e Podridão da Medula. **Comunicado Técnico** 63, 2001.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N.; FINATO, P. D.; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. Primeiro relato da podridão da estipe da pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 680-682, 2004a.

SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B.; NEVES, E. J. M.; KALIL FILHO, A. N.; MAFACIOLI, R. Doenças da pupunheira no Estado do Paraná. Colombo: Embrapa Florestas, 2004b. 4 p. (Embrapa Florestas. **Comunicado Técnico**, 90).

SANTOS, A. F.; CORRÊA, C.; NEVES, E. J. M. (Ed.) **Palmeiras para produção de palmito: juçara, pupunheira e palmeira real**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 190 p.

SANTOS, A. F. dos; FOWLER, J. A. P. Detecção de fitopatógenos em sementes de pupunheira e transmissão de *Fusarium* sp. para plântulas. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 3 p. (Embrapa Florestas. **Comunicado Técnico**, 277).

SILVA, V. L.; MÔRO, F. V.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MÔRO, J. R.; SILVA, B. M. S.; CHARLO, H. C. O. Morfologia e avaliação do crescimento inicial de plântulas de *Bactris gasipaes* Kunth. (arecaceae) em diferentes substratos. **Rev. Bras. Frutic**, vol.28, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 3, p. 477-480, Dezembro 2006

SOUSA, E. P.; SOARES, N. S.; OLIVEIRA, J. B. R.; CORDEIRO, S. A.; SILVA, M. L. Competitividade da produção de palmito de pupunheira (*bactris gasipaes* kunth.) no Brasil. In: **XLVII Congresso Brasileiro de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2009**, Porto Alegre. Desenvolvimento rural e sistemas agroalimentares: os agronegócios no contexto de integração das nações. Brasília: SOBER, 2009.

SIVIERO A; MENTEN JOM. 1995. Uso do método do palito para inoculação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em soja. **Summa Pytopathologica**. Jaguariúna, v.21, n:3-4, p. 259-260.

TOMLINSON, P.B. Essays on the morphology of palms; germination and seedlings. **Principes**, Lawrence, v. 4, n. 2, p. 56-61, 1960.

TOMLINSON, P.B. **Anatomy of the monocotyledons**. In: TOMLISON, P.B. II *Palmae*. Oxford: C.R. Metcalf, 1961. p. 308 - 311.

TOMLINSON, P.B. The structural biology of palms. Oxford, **Clarendon Press**. 460p. 1990,

TONET R. M.; FERREIRA, L. G. S.; OTOBONI, J. L. M. A. Cultura da Pupunheira. Campinas: CATI, 1999. 44 p. (CATI. **Boletim técnico**, 237).

VARGAS, E.; VILLAPLANA, M. 1979. Principales enfermedades del pejibaye observadas en Costa Rica. **ASBANA**. 3(7):8-9.

VERZIGNASSI JR; VIDA JB; GASPAROTTO F; CORTEZ GLS; LORENZETTI ER; FARIA GS; TESSMANN DJ; SEVERINO JJ. 2004. Método do palito para inoculação de *Didymella bryoniae* em melão nobre e pepino “japonês”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29(suplemento), p. 154.

YUYAMA, K.; MESQUITA, S. M. S. Crescimento de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*) transplantadas em diferentes estádios de plântula, substratos e volume de substrato. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 30, p. 515-520, 2000.

WAITE, B.H., 1953. Inoculation studies and natural infection of banana varieties with races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum f. cubense*. **Plant Disease Reporter** 61, 15-19.

CAPÍTULO I

QUALIDADE SANITÁRIA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE PUPUNHEIRA SUBMETIDAS A MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *FUSARIUM* spp. E AO TRATAMENTO QUÍMICO

RESUMO

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) é uma planta nativa da região tropical das Américas, que vem despertando acentuado interesse por parte dos agricultores devido as suas múltiplas possibilidades de utilização. Desde o ano 2000 é verificada a ocorrência da Podridão da Base do Estipe (PBE) em plantios de pupunheiras ocasionados por *Fusarium* spp.. Esta doença pode se tornar limitante para o cultivo da pupunheira, ocorrendo em plantas de pupunheira com diferentes idades, desde viveiro, sendo mais frequente em plantios com idade entre seis a doze meses. Tem-se verificado a presença do patógeno em sementes armazenadas. Os objetivos deste trabalho foram: 1) Avaliar a qualidade sanitária e fisiológica de oito lotes comerciais de sementes de pupunheira provenientes da região de Porto Velho - RO; 2) Avaliar a eficiência de dois métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira: a) método de detecção de patógenos - Blotter test; b) método do papel cartão com meio nutritivo; 3) Avaliar a agressividade e patogenicidade de isolados obtidos de sementes pupunheira, que foram inoculados em mudas sadias para verificação dos sintomas; 4) Avaliar o tratamento químico de dois lotes de sementes de pupunheira para o controle de *Fusarium* spp., onde foram testados os seguintes tratamentos: captana - 1,25; clorotalonil + tiofanato metílico - 0,3 + 0,75; tiofanato metílico - 0,7; captana + tiofanato metílico - 1,25 + 0,7; hipoclorito de sódio a 3% i.a. em g/1000g de semente, quanto a seus efeitos: a) seu efeito na sanidade; b) germinação e vigor. Houve variação entre os lotes de sementes de pupunheira quanto a suas qualidades fisiológicas e sanitárias. O fungo patogênico *Fusarium* spp. pode ser transmitido por sementes para plântulas causando a doença PBE. A metodologia do papel cartão para detecção de *Fusarium* spp., mostrou-se mais eficaz na recuperação do patógeno em sementes de pupunheira. O fungicida clorotalonil + tiofanato metílico obteve o controle efetivo do patógeno alvo *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira. Os isolados de *Fusarium* sp. oriundos das sementes de pupunheira foram identificados como: *F. oxysporum*, com patogenicidade comprovada.

Palavras-chave adicionais: palmito; patologia de sementes; controle químico.

ABSTRACT

The peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) is a native plant from the tropical region of the Americas, whose culture has aroused increasing interest on agriculturists due to its multiple use possibilities. Since 2000, the Basal stem rotting (BSR) disease has been observed in peach palm plantations caused by *Fusarium* spp.. The BSR disease may become limiting to peach palm farming, occurring in peach palm plants of different ages, since plant nurseries, more frequent in six to twelve-month-old plantations. The pathogen presence has been verified in stored seeds. The objectives of this study were: 1) Evaluating the sanitary quality of eight commercial shipments of peach palm seeds from Porto Velho – RO region in Brazil. 2) Evaluating two detection methods of *Fusarium* spp. in peach palm seeds: a) a method for detecting pathogens – Blotter test; b) a paperboard method with nutritious means, in both methods, the seed were disposed in “gerbox” boxes and incubated at 24°C for posterior visual analysis of the fungi growth therein. 3) Evaluating the aggressiveness and pathogenicity of isolates from peach palm seeds, which were inoculated in healthy seedlings for checking the symptoms. 4) Evaluating the chemical treatment of two peach palm seed shipments for controlling *Fusarium* spp., in which the following treatments had been tested: Captan – 1.25; Chlorothalonil + Thiophanate Methyl - 0.3 + 0.75; Thiophanate Methyl - 0.7; Captan + Thiophanate Methyl - 1.25 + 0.7; 3% i.a. sodium hypochlorite in g/1000g of seeds, about their effects: a) sanitary effect; b) germination and vigor. There was great variation among peach palm seed shipments on their physiologic and sanitary qualities. The *Fusarium* spp. pathogenic fungus may be transmitted by seeds to seedlings causing BSR disease. The paperboard methodology for *Fusarium* spp. detection proved to be more efficient for recovering this pathogen in peach palm seeds. The Chlorothalonil + Thiophanate Methyl fungicide achieved the effective control over the target pathogen *Fusarium* spp. in peach palm seeds. The isolates from the following species were detected in peach palm seeds: *F. oxysporum*, with verified pathogenicity.

Additional keywords: palm heart; seed pathology, chemical control.

INTRODUÇÃO

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) pertence à família Arecaceae, a qual agrega 205 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies (MORA-URPI et al., 1997). Apresenta frutos do tipo drupa, de coloração vermelha, alaranjado e amarelo. A pupunheira inicia o seu florescimento entre 3 a 5 anos (MORA-URPI et al., 1997; KULCHETSCKI; GARDINGO, 2001). A planta floresce quase o ano inteiro, porém, com maior intensidade durante os meses de agosto a dezembro. No litoral do Paraná, a floração inicia-se em novembro-dezembro, durando cerca de três meses. Os frutos amadurecem quatro meses depois, observando-se maior produção no período de julho a setembro (KULCHETSCHI; GARDINGO, 2001).

Durante a colheita dos frutos de pupunheira, muitas vezes, os frutos são coletados no chão e, com isso, podem ser contaminados por patógenos de solo. Alguns desses patógenos, como o *Fusarium* spp., podem associar-se à superfície das sementes e, mais tarde, provocar redução no estande de plantas. Para recuperar esta falha, é necessária uma nova semeadura, o que onera os custos de produção, além do risco da muda infectada levar a doença para o campo (SANTOS et al. 2008).

A podridão da base do estipe (PBE) também chamada de podridão da medula pode ser causada pelo fungo do gênero *Fusarium*, caracterizando-se pela podridão da medula ou coração do palmito. Como sintoma reflexo, provoca o amarelecimento, o murchamento e a seca das folhas, devido à podridão da base, a qual se estende à medula e a todo o palmito, que fica com coloração pardo-escura. Ocorre em plantas de pupunheira com diferentes idades, desde viveiro, sendo mais frequente em plantios com idade entre seis a doze meses (SANTOS et al., 2001).

Em seu trabalho com isolamento de fungos endofíticos em pupunheira, Costa Neto (2002), destaca que por ser oriunda da Amazônia e plantada em outras regiões, a incidência de doenças poderá ser um fator preocupante, uma vez que haverá alterações fisiológicas no cultivo em decorrência do adensamento nos plantios.

Nas sementes de pupunheira armazenadas, segundo Ferreira (1988) verifica-se o ataque por diversos fungos, entre eles várias espécies de *Fusarium*. Coates-Beckford & Chung (1987) citaram *Fusarium solani* como o principal responsável pela queda da germinação de sementes de pupunheira levadas à Jamaica. Enquanto que, Bovi (1993), afirmou que, normalmente, os fungos penetram na semente antes da colheita do fruto. Bovi (1998) relata que essa contaminação pode, também, acontecer por ocasião do manuseio e armazenamento inadequados.

A expansão do cultivo das palmeiras para palmito para diversas regiões brasileiras; a execução de plantios durante todo o ano, às vezes em épocas desfavoráveis; a alta demanda por

mudas e o seu manejo inadequado têm favorecido a incidência de problemas bióticos e abióticos, principalmente na fase de produção de mudas (SANTOS et al. 2007).

O conhecimento dos microrganismos patogênicos encontrados nas sementes é um princípio de controle para eviotar a sua disseminação (LAZAROTTO, 2010).

Devido à escassez de informações e a heterogeneidade de lotes das fontes provedoras de sementes de pupunheira, sendo estas, em maior parte provenientes da região Amazônica brasileira e do país vizinho Perú, surge a necessidade da inspeção e tratamento desse material propagativo a fim de verificar suas condições sanitárias para evitar a disseminação de patógenos. Faz-se necessário também estudos acerca de sua qualidade fisiológica.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos: a) avaliar a qualidade sanitária e fisiológica (germinação, emergência, umidade e vigor) de oito lotes comerciais de sementes de pupunheira provenientes da região de Porto Velho - RO; b) avaliar dois métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira: Blotter test e papel cartão; c) avaliar a transmissão de *Fusarium* spp. de sementes para plântulas de pupunheira, assim como a agressividade de isolados obtidos de sementes e inoculados em mudas de pupunheira; d) avaliar o efeito do tratamento químico de dois lotes de sementes de pupunheira para o controle de *Fusarium* spp., na sanidade e germinação destas.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de Sementes Florestais e Patologia Florestal e na casa de vegetação da Embrapa Florestas, em Colombo – PR. Para atender os objetivos propostos, quatro experimentos compostos de oito ensaios foram desenvolvidos no período de dezembro de 2011 a novembro de 2012.

As sementes utilizadas foram cedidas pelo viveiro Flora do Vale, localizado em Garuva - SC. Foram avaliados oito lotes comerciais (01A, 02A, 02E, 02G, 02D, VR1, T, RECA) de sementes de pupunheira provenientes da região de Porto Velho - RO. As sementes foram armazenadas adequadamente até a conclusão de todos os ensaios, em local arejado e protegido da luz e do calor, com temperatura em torno de 20°C.

1. Qualidade sanitária de sementes de pupunheira.

1.1. Comparação entre métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira

O primeiro método testado foi o Blotter test, Neergaard (1979), sendo utilizadas 100 sementes de cada lote. As sementes foram distribuídas em caixas do tipo gerbox, previamente desinfestadas com álcool 70 % e solução de hipoclorito de sódio 1%, contendo duas folhas de papel mata-borrão esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada até atingir elevado grau de umidade, próximo ao seu ponto de saturação, garantindo um ambiente favorável para o crescimento de fungos nas sementes. Cada caixa recebeu dez sementes sobre o papel umedecido (Figura 4 A e B), sendo tampadas a seguir (SANTOS et al., 2011).

As sementes foram incubadas em sala climatizada (Figura 4G) sob lâmpadas fluorescentes de 20W, em fotofase de 12 h, à temperatura de 20 ± 1 ° C, durante sete dias. Ao término deste período de incubação as sementes foram retiradas e levadas ao laboratório para avaliação por meio da inspeção do material com auxílio de microscópio estereoscópico para realizar a identificação e a quantificação dos fungos. Quando necessário, lâminas foram feitas utilizando microscópio óptico para visualização de estruturas do fungo alvo e auxiliar na determinação do gênero, conforme descrições de Barnett e Hunter (1972).

No segundo método para detecção de fungos, o método do papel cartão, sendo as sementes dispostas em caixas gerbox também desinfestadas e contendo folhas de papel mata-borrão esterilizado. Sobre estas folhas foi depositada uma folha de papel cartão azul esterilizado (Figura 4D), banhado com uma lâmina de meio nutritivo (Figura 4C) preparado com 15 g de peptona, 5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1g de KH_2PO_4 e 1g de PCNB (Pentacloronitrobenzeno) em 1000 mL de água destilada (ANDERSON, 1986). As sementes permaneceram incubadas nas mesmas condições que o tratamento anterior, porém por um maior período de tempo (14 dias). Ao final do período de incubação as sementes foram examinadas conforme metodologia anterior.

Os tratamentos para o presente ensaio foram constituídos de oito lotes comerciais de sementes de pupunheira (01A, 02A, 02E, 02G, 02D, VR1, T, RECA) oriundos da região de Porto Velho - RO, submetidas a dois métodos de detecção de fungos, seguindo o esquema fatorial 8 x 2 (lotes x métodos), dispostas no delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições de 20 sementes cada.

Os resultados dos testes de ambos os métodos foram expressos em porcentagem de cada fungo detectado por lote. Os dados relativos a incidência de fungos em sementes foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



FIGURA 1. A e B: Método de detecção de fungos Blotter-test; C: Caldo nutritivo para método do Papel cartão; D: Método do Papel cartão; E, F, G: Disposição dos tratamentos para as duas metodologias de detecção de fungos em sala climatizada (20 °C) e fotofase de 12h.

1.2. Transmissão de *Fusarium* spp de sementes à plântulas

Para o teste de transmissão de patógenos das sementes às plântulas adotaram-se oito tratamentos, considerando que, cada tratamento foi composto por 100 sementes de cada um dos oito lotes comerciais de sementes de pupunheira oriundas da região de Porto Velho - RO, em duas repetições de 50 sementes cada. As sementes foram colocadas em caixas plásticas (Figura 5), com o fundo vazado para escoamento de líquidos, nas dimensões de 50 x 30 cm, preenchidas com vermiculita autoclavada. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com duas repetições de cada tratamento.

O material foi mantido em casa de vegetação do laboratório de Patologia Florestal na Embrapa Florestas. Foram feitas regas periódicas para manutenção da umidade do material. A cada sete dias após a semeadura foram feitas avaliações observando a ocorrência de sintomas em plântulas e a verificação de sementes germinadas.

Ao término do teste as sementes não germinadas foram lavadas com água corrente e a seguir submetidas ao teste de sanidade com Papel cartão, conforme Anderson (1986). As plântulas sintomáticas foram retiradas do substrato e lavadas com água corrente, a seguir colocadas em câmara úmida por sete dias, com temperatura de ± 21 °C. Após este período, as plântulas com sintomas foram analisadas para verificar a presença de sinais do patógeno, com o auxílio de microscópio estereoscópio e óptico.

Calculou-se a taxa de transmissão do patógeno, da semente para as plântulas, a partir da fórmula sugerida por Forcelini (1991):

$$T.T(\%) = (T.I(\%) \times 100) / I.S(\%)$$

Em que: T.I = taxa de infecção em plântulas de pupunheira com sintomas de PBE.

I.S = incidência de *Fusarium* spp. em sementes (teste de sanidade com papel cartão no item 2.1)

2. Qualidade fisiológica das sementes de pupunheira

A qualidade fisiológica de sementes de pupunheira foi determinada pelo teor de umidade, germinação, emergência e vigor dos oito lotes de sementes comerciais avaliados.

2.1 Teor de água

Para determinação do teor de água das sementes foi conduzido o ensaio de determinação do grau de umidade por método da estufa a $105^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 24h (BRASIL, 2009). Para isso utilizou-se uma balança de precisão de 0,001g, cadinhos numerados e tarados, onde foram depositadas cinco sementes em cada. Os oito tratamentos foram constituídos de cada

respectivo lote de sementes, com duas repetições de cinco sementes cada. Os dados relativos ao teor de umidade das sementes foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

2.2 Germinação

A percentagem da germinação de sementes de pupunheira foi determinada pela metodologia padrão do laboratório de Sementes Florestais da Embrapa Florestas. Para isso utilizou-se 100 sementes de cada lote, divididas em quatro sub-amostras de 25 sementes. As sementes foram dispostas em caixas do tipo gerbox grande (Figura 6) com dimensões de 20 x 30 cm, previamente desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio 1% . As caixas foram preenchidas com aproximadamente 3,5 kg de areia grossa, segundo classificação na escala granulométrica de Atterberg (0,2 - 2,0 mm), peneirada em malha 2 mm, lavada e autoclavada. A quantidade de areia foi determinada de modo que fosse suficiente para acomodar as sementes, recobrando-as sem que ficassem expostas e de forma que não tocassem no fundo da caixa.

As sementes foram incubadas em germinador à temperatura de 30 °C. Regas semanais com água destilada foram realizadas a fim de manter o substrato com umidade constante, suficiente para o crescimento do embrião e aeração satisfatória.

A contagem de sementes germinadas foi realizada três vezes por semana, durante 80 dias, removendo-se cuidadosamente a areia superficial para facilitar visualização das estruturas da semente germinada. O primeiro sinal visível da germinação corresponde ao eriçamento das fibras do tampão fibroso, uma porção que emerge da semente e surge como uma massa de células não diferenciadas, chamada de botão germinativo (Figura 7C).

Posteriormente, o botão germinativo torna-se cilíndrico, diferenciando-se em primórdios caulinares e radiculares formando a lígula e a plúmula (Figura 7D), uma estrutura tubular que se destaca com o desenvolvimento das estruturas seguintes (FERREIRA, 2005).

A semente foi considerada germinada a partir da visualização da massa cotiledonar esbranquiçada na região do opérculo, com formação do botão germinativo (Figura 7C).

Os tratamentos foram constituídos dos oito lotes comerciais (01A, 02A, 02E, 02G, 02D, VR1, T, RECA) de sementes de pupunheira dispostos no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes. Os dados relativos a percentagem de germinação das sementes foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

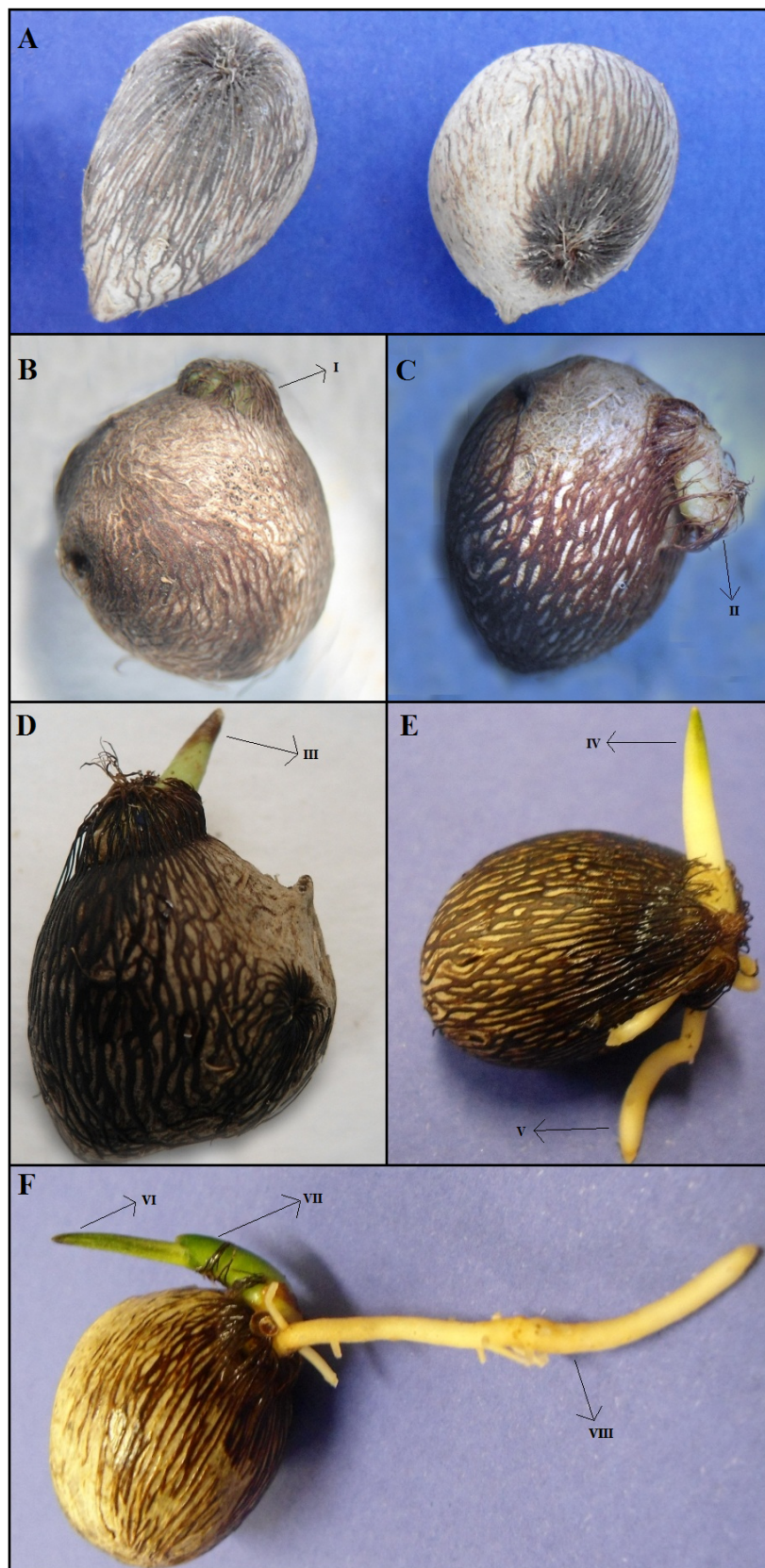


FIGURA 2. Germinação de sementes de pupunheira: Estádios das plântulas de pupunheira: **A:** Sementes não intumescidas; **B** I: Emissão do pecíolo cotiledonar; **C** II: Botão germinativo; **D** III: Lígula; **E** IV: Primeira bainha, V: primórdios radiculares; **F** VI: segunda bainha, VII: primeira bainha, VIII: radícula.

2.3 Emergência

Para a determinação de plântulas emergidas, oito lotes comerciais de sementes de pupunheira foram mantidos em casa de vegetação dispostos em canteiro de 7,20 x 0,60 m de área útil, com oito parcelas de 0,54 m². o substrato consistiu de areia grossa (0,2 - 2,0 mm) lavada, não peneirada, permanecendo com agregados graúdos (> 2,0 mm) como britas e cascalhos.

A irrigação da casa de vegetação foi automatizada, com sistema de irrigação por micro aspersão com quatro regas diárias de 15 minutos de duração cada, convencionadas nos horários 8h; 11h; 14h e 17h.

O critério utilizado na avaliação da emergência foi a visualização e contagem de estruturas visíveis acima do nível do substrato (Figura 8). Na parte inferior da lígula emerge uma raiz e na porção superior surge a primeira bainha plumular. A segunda bainha plumular surge de dentro da primeira e, dessa, emerge o primeiro eófilo, com folha bífida. (FERREIRA, 2005).

A contagem de plântulas emergidas foi realizada semanalmente, durante 120 dias. Ao término deste período, foi realizada a última contagem de plântulas emergidas, e retiradas as sementes não germinadas, sendo classificadas como sementes duras (aparentemente dormentes), e mortas (em estágio de decomposição).

As sementes duras, não germinadas, foram lavadas e colocadas em câmara úmida a temperatura ambiente de laboratório durante 10 dias. Durante esse período foi observado se houve algum crescimento fúngico nas mesmas.

Os tratamentos foram constituídos dos oito lotes comerciais (01A, 02A, 02E, 02G, 02D, VR1, T, RECA) de sementes de pupunheira, com dez repetições de dez sementes cada. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, sendo utilizadas 100 sementes por lote, dispostas em 10 linhas com espaçamento 0,05 m entre linha e 0,08 m entre planta (Figura 3). A percentagem da emergência das sementes foi submetida à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

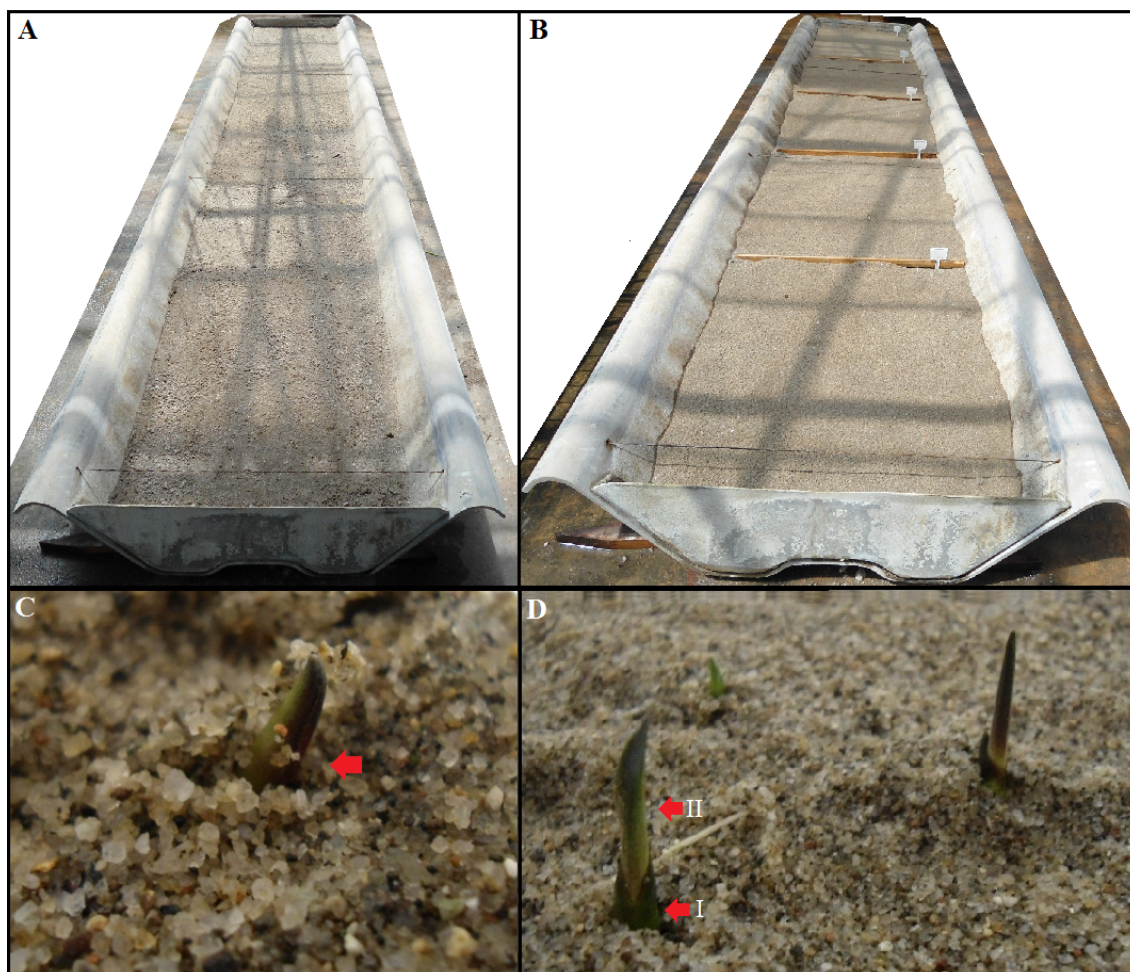


FIGURA 3. Preparação do canteiro para teste de emergência e estruturas iniciais das plântulas emergidas. A: Canteiro com substrato areia; B: parcelas divididas e sinalizadas; C: plúmula (seta); D: primeira bainha (seta I); segunda bainha (seta II).

2.4. Vigor

O teste de vigor foi baseado em dados dos ensaios anteriores de germinação e emergência. Foram avaliados a porcentagem de plântulas germinadas e emergidas, a velocidade e o índice de germinação e emergência, por serem associados, frequentemente, de forma positiva, com o vigor de plantas de pupunheira, tanto em condições de viveiro como de campo (BOVI, 1998; BOVI et al., 1993).

A velocidade de emergência visa comparar o vigor de lotes semeados na mesma época. Foram feitas observações diárias até o aparecimento da primeira semente germinada, ou plântula emergida, conforme o experimento. Contou-se, a cada dois dias, o número de sementes germinadas/ plântulas emergidas de cada linha ou repetição, sendo estabelecido conforme metodologia padrão do laboratório de Sementes Florestais da Embrapa Florestas, durante 80 dias para germinação e 120 para emergência.

A variável velocidade de emergência ou germinação foi dada pelo somatório do produto do número de dias da semeadura da primeira a última contagem após semeadura pelo número de plântulas germinadas em cada contagem dividido pelo somatório do número de plântulas emergidas/ sementes germinadas. O lote cuja média for menor, será o que levou menos dias para as sementes germinarem/ plântulas emergirem do substrato, sendo, portanto, o que apresentou a maior velocidade de germinação/emergência. Para o cálculo de velocidade de germinação/ emergência, emprega-se a fórmula de Edmond e Drapala (1958).

$$VE \text{ ou } VG = \frac{(N_1 \times E_1) + (N_2 + E_2) + \dots + (N_n + E_n)}{E_1 + E_2 + \dots + E_n}$$

onde:

VE = Velocidade de emergência ou VG para germinação em sementes.

E_1, E_2, \dots, E_n = número de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem.

N_1, N_2, \dots, N_n = número de dias da semeadura à primeira, segunda, ..., última contagem.

Outro parâmetro analisado foi o índice de velocidade emergência/ germinação, obtido pelo somatório da razão do número de plântulas emergidas/ sementes germinadas, computadas nas avaliações, pelo número de dias da semeadura da primeira a última contagem. O valor para o lote será a média aritmética dos resultados obtidos para as repetições propostas em cada ensaio. O lote que resultar o maior valor de IVE será o que apresenta a maior velocidade de emergência de plântulas e consequentemente o de maior vigor.

$$IVE \text{ ou } IVG = \frac{E_1}{N_1} + \frac{E_2}{N_2} + \dots + \frac{E_n}{N_n}$$

onde:

IVE ou IVG = Índice de Velocidade de emergência ou germinação.

$E_1, E_2, E_n, N_1, N_2, N_n$ = mesmos significados da fórmula anterior.

Outro fator utilizado para a determinação do vigor relativo do lote foi o percentual de plântulas normais vigorosas, obtida pelos testes de germinação e emergência. O estágio com o "primeiro eófilo expandido" também conhecido como "primeira folha bífida expandida" pode ser considerado como critério para caracterização da formação de uma "plântula normal". (FERREIRA, 2005).

Foram consideradas sementes duras aquelas que permaneceram sem absorver água por um período de tempo mais longo que o normal e no final dos testes, estavam com aspecto de sementes recém-colocadas no substrato, isto é, não intumescidas. Foram consideradas como sementes mortas, aquelas que no final do teste não germinaram, apresentando-se amolecidas, atacadas por microrganismos e não apresentavam nenhum sinal de germinação (BRASIL, 2009).

Os valores de IVE, VE, IVG e VG foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.0. Patogenicidade e agressividade de isolados de *Fusarium* spp. obtidos a partir de sementes de pupunheira

Os isolados de *Fusarium* spp. foram obtidos a partir de sementes contaminadas nos testes de avaliação da qualidade sanitária das sementes. O patógeno alvo foi confirmado mediante visualização de estruturas do fungo sob microscópio estereoscópico e óptico (Figura 9), isolado em meio batata-água-dextrose (BDA) suplementado com ampicilina (80 ppm) e cloranfenicol (40 ppm), e, então, incubado em BOD por dez dias a 24 °C, até o aparecimento de colônias de *Fusarium* spp. Um isolado da coleção de fungos do laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas (SP3 e SP5), comprovadamente patogênico, foi utilizado (Tabela 1).

Os isolados foram inoculados por meio da metodologia de injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* spp. em mudas de pupunheira com seis meses de idade. O método consistiu em fazer uma incisão na base do colo da muda de pupunheira previamente desinfestado com álcool 70% , utilizando uma seringa descartável com agulha hipodérmica nas dimensões de 1,20 x 40 mm. Neste ponto procedeu-se a injeção de uma alíquota de 0,1mL de suspensão de conídios (Figura 9) a uma concentração de $3,25 \times 10^6$ conídios/mL, injetado-se água destilada e esterilizada nas testemunhas.

TABELA 1: Isolados de *Fusarium* spp. utilizados nos ensaios, origens e procedências:

Isolado	Origem	Procedência
1A	Semente	Porto Velho - RO
3A	Semente	Porto Velho - RO
SP3	Coleção da Embrapa Florestas	-

A avaliação foi realizada semanalmente, verificando-se a presença de plantas sintomáticas. Para a avaliação foi usada uma escala descritiva, com notas de 1 a 4.

Os tratamentos foram constituídos dos três isolados de *Fusarium* spp. e suas respectivas testemunhas, dispostos no delineamento inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, e cada planta inoculada correspondendo a uma unidade experimental.

Os dados relativos à incidência expressos em percentagem, e à severidade da doença (baseado em uma escala descritiva com notas de 1 a 4), foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

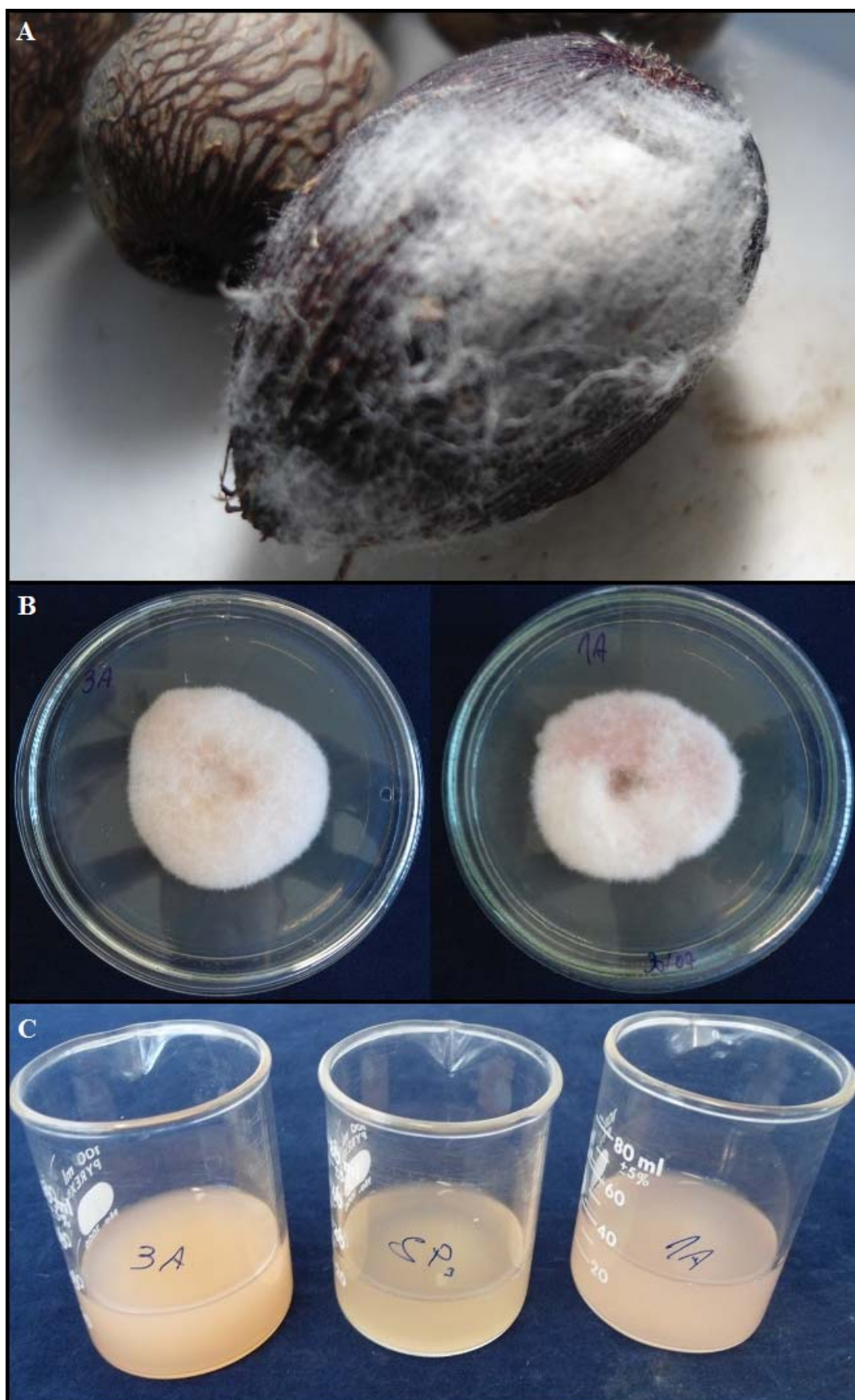


FIGURA 4. Obtenção de isolados de *Fusarium* spp. A: Semente de pupunheira com micélio de *Fusarium* spp.; B: colônias de *Fusarium* spp.; C: Suspensão de conídios de três isolados.

4.0. Tratamento químico de sementes de pupunheira para o controle de *Fusarium* spp.

Dois lotes de sementes de pupunheira (02E e VR1) foram previamente selecionados com base no ensaio anterior de sanidade Blotter test (item 1.1), com os seguintes valores de incidência de *Fusarium* sp.: lote 02E - 4% e VR1 - 7%.

O experimento foi dividido em duas partes, conforme segue: a primeira parte refere-se à sanidade de sementes após o tratamento químico com três fungicidas, e hipoclorito de sódio a 3% (Tabela2). A segunda refere-se a avaliação das sementes quanto ao seu vigor em um teste de germinação.

Neste ensaio, os dois lotes de sementes de pupunheira receberam seis tratamentos nas respectivas doses de ingrediente ativo (i.a.) em g/kg de sementes dos seguintes produtos: captana - 1,25 g i.a./1kg de sementes; clorotalonil + tiofanato metílico - 0,3 + 0,75 g i.a./1kg de sementes; tiofanato metílico - 0,7 g i.a./1kg de sementes; captana + tiofanato Metílico - 1,25 + 0,7 g i.a./1kg de sementes; hipoclorito de sódio (NaOCL) a 3% e testemunha.

No preparo da solução fungicida foi adicionado uma água, correspondente a 5% do peso médio das sementes. As sementes foram colocadas em um saco plástico e agitadas com a solução fungicida durante cinco minutos.

Para o tratamento de NaOCI a 3%, as sementes ficaram imersas na solução durante 10 minutos.

TABELA 2: Especificações dos fungicidas utilizados: nome comum, nome comercial e produto comercial (p.c.) por 1kg de sementes.

Nome Comum	Nome Comercial	p.c./ 1kg sementes
Captana	Orthocide 500	2,5
Clorotalonil + Tiofanato Metílico	Cerconil WP	1,5
Tiofanato Metílico	Cercobin 700 WP	1,0
Captana + Tiofanato Metílico	Mistura	2,5 + 1,0

4.1. Sanidade das sementes

Após as sementes receberem os respectivos tratamentos, procedeu-se o teste de sanidade, Blotter test (NEEGARD, 1979). Os procedimentos adotados foram os mesmos do item 1.1.

Os tratamentos para o presente ensaio foram constituídos de dois lotes comerciais de sementes de pupunheira (02E e VR1), submetidas a seis tratamentos, seguindo o esquema fatorial 2 x 6 (lotes x métodos), dispostos no delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições de 20 sementes cada.

Os resultados dos tratamentos foram expressos em porcentagem de cada fungo detectado por lote. Os dados relativos à incidência de fungos em sementes foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2 Germinação e vigor

Após o tratamento das sementes foi realizado o teste de germinação, conforme metodologia descrita no item 1.2. Para isso, 100 sementes de cada lote, foram divididas em cinco sub-amostras de 20 sementes, dispostas em caixas do tipo gerbox (Figura 7) previamente desinfestadas com álcool 70% e hipoclorito de sódio 1% .

Houve apenas uma pequena modificação em relação ao gerbox utilizado. Devido a maior praticidade e otimização de espaço no germinador, conforme rotina do laboratório de Sementes da Embrapa Florestas, optou-se pelo uso do gerbox pequeno (Figura10). Colocou-se 20 sementes em cada gerbox, constituindo-se cinco repetições por lote. Os demais fatores como temperatura, substrato e grau de umidade do mesmo, foram mantidos conforme experimento de germinação anterior.

Para o teste de vigor foram avaliados a porcentagem de sementes germinadas, a velocidade de germinação e o índice de velocidade de germinação, empregando-se a fórmula de Edmond e Drapala (1958). Foram feitas observações diárias a cada dois dias contabilizando o número de sementes germinadas por repetição durante 80 dias.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias de incidência dos fungos comparadas pelo teste Tukey a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Qualidade Sanitária de Sementes de Pupunheira

Comparação entre métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira.

No Blotter test verificou-se alta incidência de fungos contaminantes (Tabela 3). Segundo Mathur (1983) e Neergaard (1983), a incidência de muitos fungos e bactérias contaminantes, que crescem rapidamente neste substrato, podem impedir a frutificação dos fungos-alvo, dificultando a sua identificação e quantificação, sobretudo daqueles de crescimento lento, como é o caso de *Fusarium* spp. Neste método, as colônias de *Fusarium* spp. apresentaram crescimento lento, quando comparadas a outros fungos (Figura 8) contaminantes detectados: *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Botrytis* sp., *Nigrospora* sp. e *Trichothecium* sp. (Figura 11).

TABELA 3. Incidência média de *Fusarium* spp. e outros fungos* em oito lotes comerciais de sementes de pupunheira oriundas da região de Porto Velho - RO, submetidas a dois métodos de detecção de fungos.

Fungos	Ocorrência ¹			Incidência média (%)	
	Blotter test	Papel cartão	Coincidência ²	Blotter test	Papel cartão
<i>Fusarium</i> spp.	6	7	6	2,55	2,75
Outros fungos*	8	8	8	34,12	7,87

¹ Número de amostras avaliadas = 8; ² Número de vezes em que houve coincidência na detecção de *Fusarium* spp. entre os dois métodos. * **Outros fungos:** *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Botrytis* sp., *Nigrospora* sp. e *Trichothecium* sp.

O método do papel cartão para detecção de *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira mostrou-se mais eficiente, atingindo incidências médias superiores ao método Blotter test (Tabela 8). Mesmo as sementes sendo incubadas por 14 dias no papel cartão, o dobro do tempo para o Blotter test, houve redução da presença de fungos contaminantes, desta maneira apresentando índice de contaminação inferior ao Blotter test (Figura 12). Além disso, a metodologia Blotter test, outro problema verificado para o seu uso na detecção de *Fusarium* spp. é que a incidência pode ser subestimada (Tabela 3), como já verificado por Tempe (1970); Neergaard (1973) e Reis *et al.*, (1999).

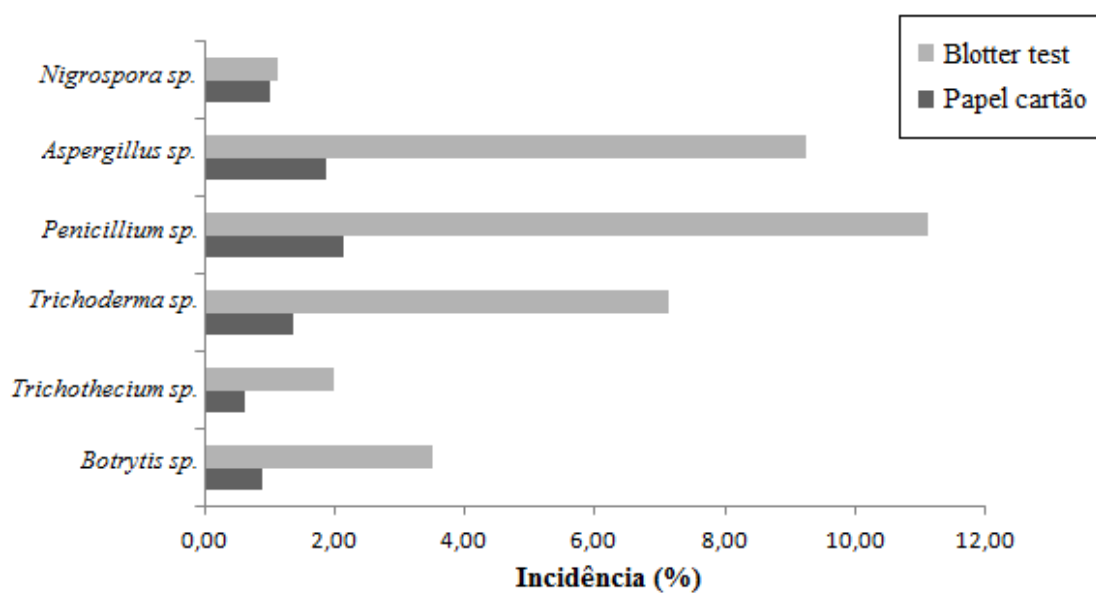


FIGURA 5. Incidência de fungos detectados em oito lotes comerciais de sementes de pupunheira oriundas da região de Porto Velho - RO.

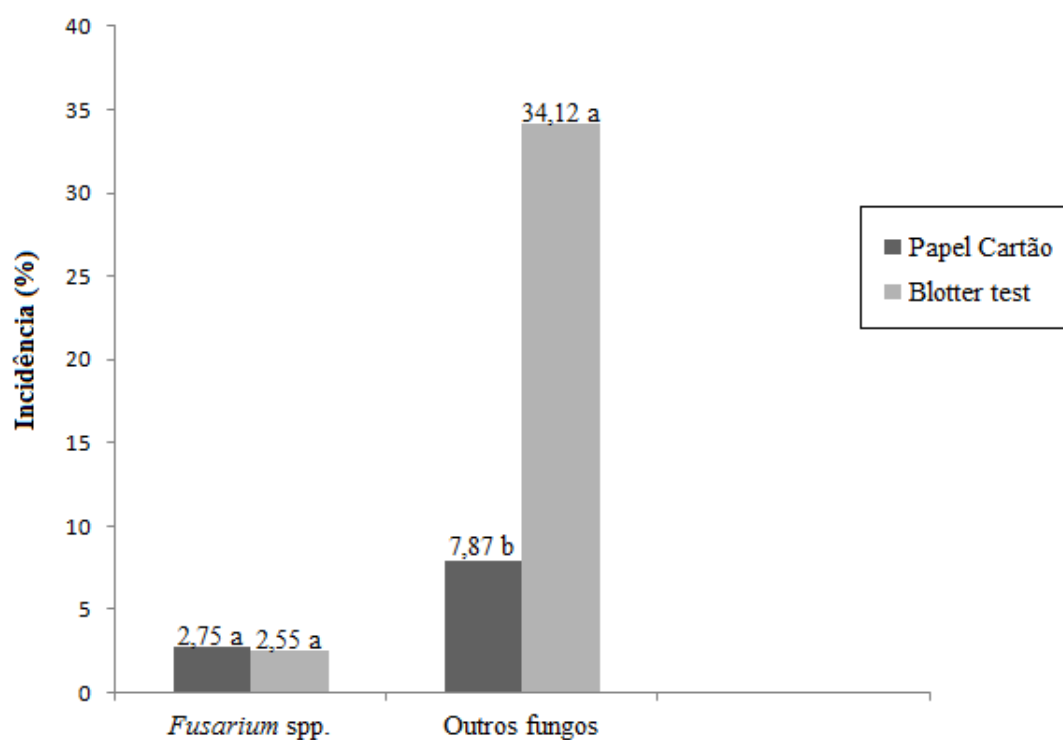


FIGURA 6. Incidência de *Fusarium spp.* e outros fungos em oito lotes comerciais de sementes de pupunheira oriundas da região de Porto Velho - RO. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

O método do papel cartão apresentou maior especificidade para detecção de *Fusarium* spp., proporcionando maior recuperação de patógenos de sete em oito lotes avaliados com uma incidência total nos lotes de 2,75% (Tabela 3). Enquanto que, a metodologia do Blotter test, por muitas vezes a contaminação excessiva de alguns lotes, que resultava em grande crescimento fúngico nas sementes e no próprio papel, dificultava a visualização e identificação de todos os fungos presentes nas sementes infestadas (Figura 13C). A cor do papel azul da metodologia do papel cartão facilitou a visualização de micélio de *Fusarium* spp., geralmente de cor clara: branco, cinza e rosáceo, na maioria das colônias observadas.

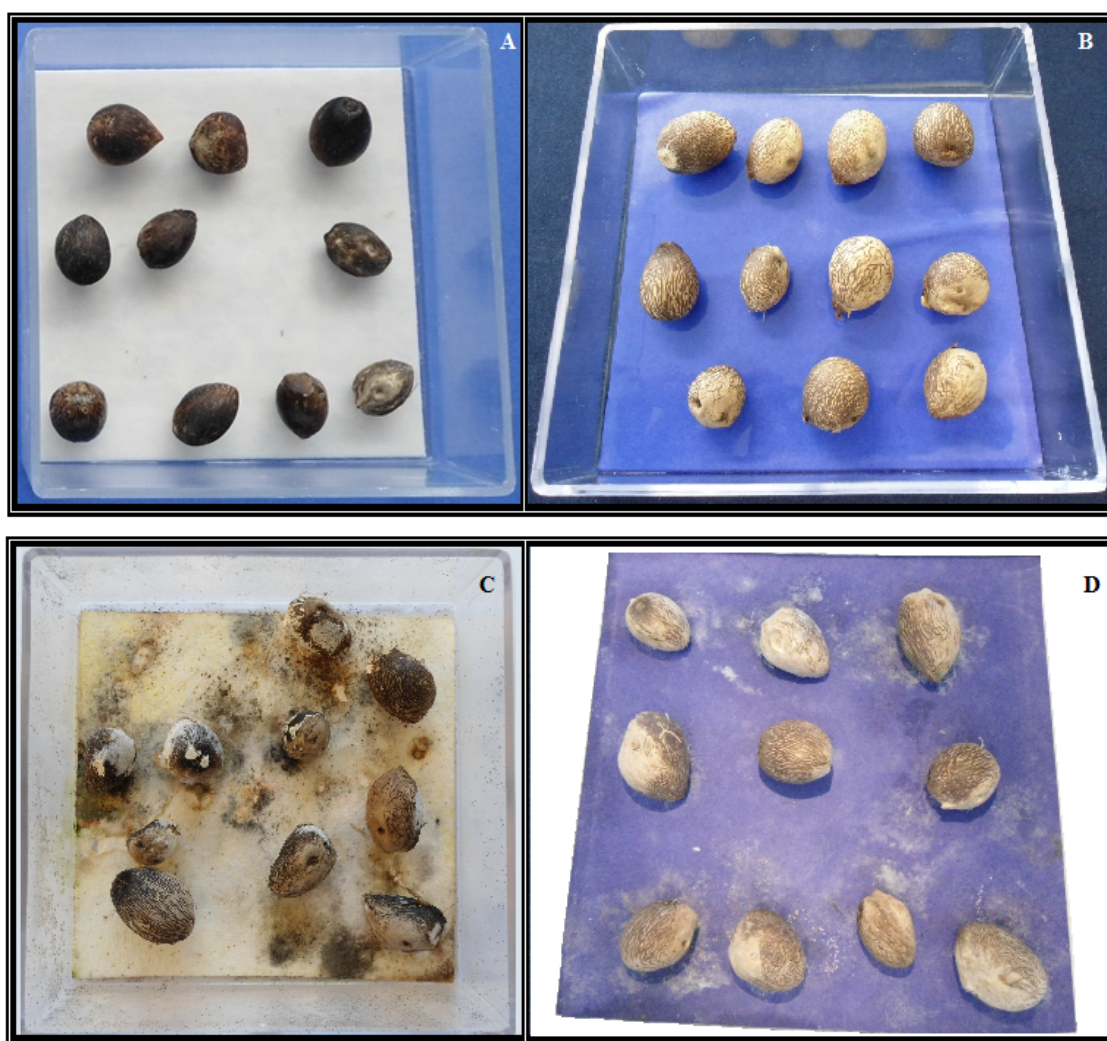


FIGURA 7. Métodos de detecção de fungos em sementes de pupunheira: Blotter test (A - instalação e C - na avaliação após sete dias de incubação) e Papel cartão (B - instalação e D - na avaliação após 14 dias de incubação).

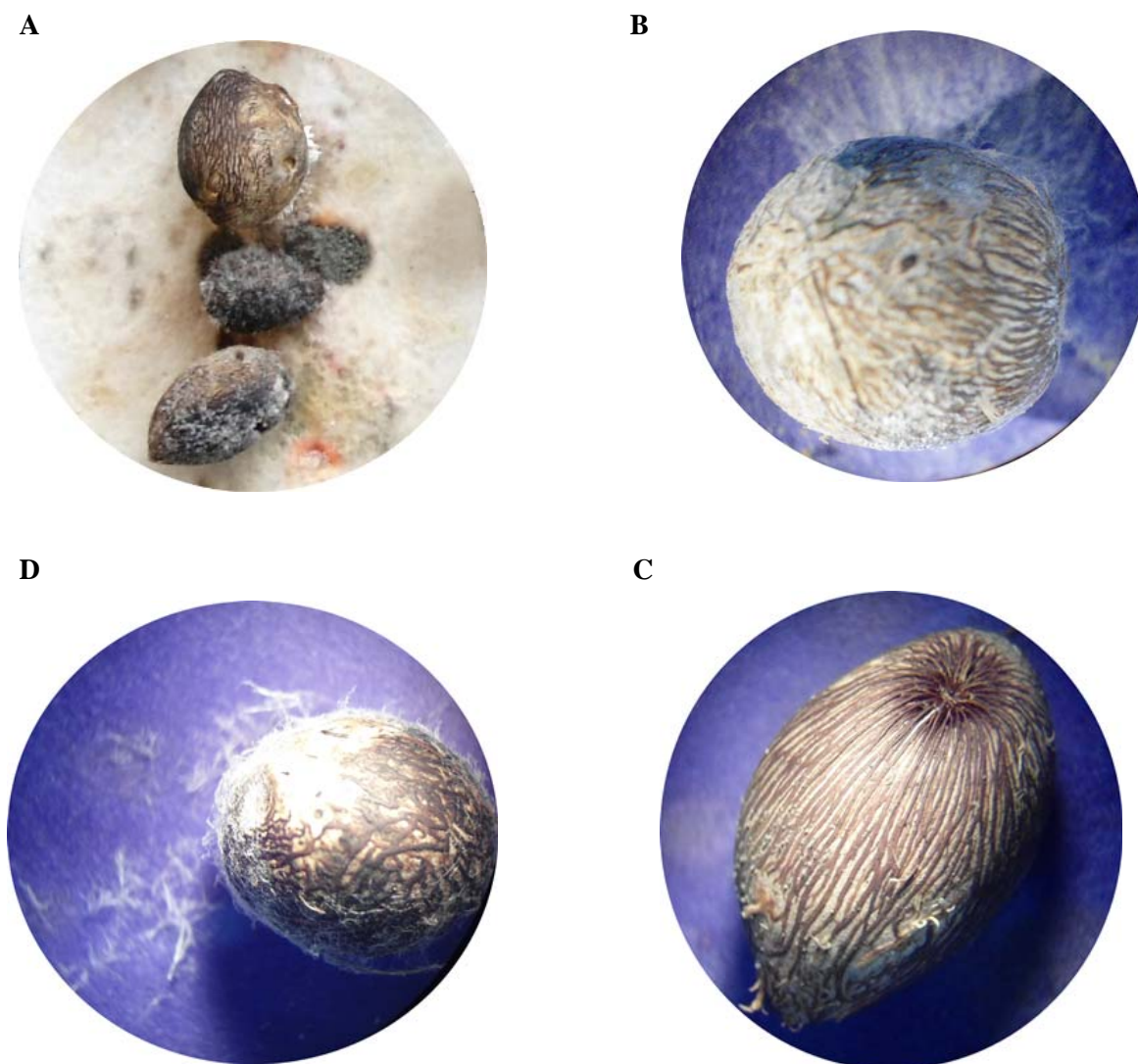


FIGURA 8. Teste de sanidade em sementes de pupunheira: A: sementes contaminadas com diversos fungos em método de detecção Blotter test; B e C: sementes de pupunheira com crescimento micelial de *Fusarium* spp. em Papel cartão; D: semente de pupunheira sadia em papel cartão.

Em estudos com fungos associados a sementes de pupunheira, Santos (2011), relatou a presença de vários fitopatógenos, destacando-se o gênero *Fusarium* com valores entre 6 a 45% das sementes infectadas. Este autor relatou também a baixa porcentagem de germinação das sementes.

Os lotes que apresentaram maiores incidências de outros fungos detectados foram 01A, 02A, VR1 e 02G. Na Tabela 4 pode-se observar que os lotes VR1 e 02E foram os que apresentaram maiores contaminações por *Fusarium* spp., e que de modo geral a incidência deste patógeno não apresentou grande variação entre os métodos de detecção avaliados. Apenas o lote VR1 diferiu significativamente dos lotes 02D, RECA e T. Os quatro lotes restantes apresentaram valores intermediários.

O teste de médias não foi significativo na comparação entre as metodologias testadas para detecção de *Fusarium* spp. (Tabela 5). No entanto, verificou-se a redução da presença de outros fungos no papel cartão, facilitando a visualização do patógeno alvo, *Fusarium* spp.

TABELA 4. Dados referentes ao número de sementes infestadas com *Fusarium* spp. e outros fungos em oito lotes avaliados com as metodologias de Blotter test e Papel cartão.

Lotes	Outros fungos		<i>Fusarium</i> spp.	
	Blotter test	Papel cartão	Blotter test	Papel cartão
01A	83	7	2	2
02A	77	5	2	3
02G	16	7	3	2
02E	39	9	4	3
02D	15	9	0	1
RECA	6	6	0	0
T	4	3	2	2
VR1	33	17	7	9

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade. CV(%) = 21,54; 14,31.

Em estudos com sementes de pupunheira, Bovi et al. (1993) detectaram a incidência de, *Fusarium oxysporum*, assim como outros fungos, em sementes de pupunheira importadas do Peru. Estes autores consideraram que a associação destes microrganismos a sementes de pupunheira estavam invariavelmente associados a lotes com baixa porcentagem de germinação. Além disso, por ser um dos agentes causais da PBE, e ser um fungo habitante do solo, de difícil controle, deve-se adotar medidas que dificultem a sua introdução em novas áreas via sementes contaminadas (SANTOS et al., 2011).

Teste de Transmissão

Os resultados do teste de transmissão de *Fusarium* spp., demonstram que é possível a transmissão de *Fusarium* spp. para plântulas através de sementes contaminadas. (Tabela 6).

Foram contadas as plântulas emergidas, sadias e sintomáticas (Figura 13). Ao término do período de avaliação do teste de transmissão, com duração de 120 dias, as sementes foram coletadas do substrato e submetidas à câmara úmida. Neste teste foram encontrados além de *Fusarium*, outros fungos, tais como: *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Trichothecium* sp., *Rhizopus* sp. e *Helminthosporium* sp.

TABELA 5. Incidência de *Fusarium* spp. em sementes e plântulas de pupunheira submetidas ao teste de transmissão em substrato vermiculita. Taxa de transmissão do patógeno em plântulas e incidência de emergência dos oito lotes de sementes.

LOTES	Emergência (%)	Taxa de transmissão (%)	Detecção de <i>Fusarium</i> spp.	
			Plântulas emergidas (%)	Sementes não germinadas (%)
1A	13 b	50	1	2
2A	9 b	67	0	1
O2E	11 b	100	4	8
O2G	14 b	50	1	2
O2D	20 ab	0	0	2
RECA	29 ab	0	0	0
T	35 a	100	3	5
VR1	33 a	86	6	9

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

A temperatura influenciou na germinação das sementes neste e nos ensaios anteriores realizados em casa de vegetação. Em relação à temperatura alguns trabalhos evidenciam a relação positiva entre temperatura e germinação para sementes de palmeiras. Sabe-se que a temperatura exerce grande influência na germinação de sementes viáveis (ELLISON e ELLISON, 2001). As sementes de palmeiras de regiões tropicais germinam melhor em temperaturas entre 34 °C e 37 °C. Apesar da baixa germinação, observou-se a transmissão de *Fusarium* spp. da semente para as plântulas. Este método permite a expressão do potencial do inóculo dos patógenos associados a sementes (LUCCA FILHO, 1991). Os lotes que apresentaram maior contaminação foram VR1, O2E e T, tanto para sementes como em plântulas.

A taxa de transmissão (Tabela 6) mostrou que, apesar da baixa incidência de *Fusarium* spp. na avaliação inicial de sanidade realizada nos lotes de sementes de pupunheira, a transmissão destes pode ser considerada alta, sendo evidenciada pelas taxas com valores iguais ou superiores a 50% na maioria dos lotes contaminados com o fungo associado à PBE.

Aos 100 dias após a semeadura, poucas plântulas já haviam atingido um estágio de desenvolvimento mais avançado (Figura 12A), apresentando as primeiras folhas (eófilos) em início de expansão. Porém, de modo geral, a germinação e o desenvolvimento das plântulas no presente ensaio utilizando-se substrato vermiculita, mostrou-se inferior aos ensaios anteriores com substrato areia, demorando mais a germinar e emergir a superfície (Figura 15A).

Foi possível observar sinais de *Fusarium* spp. em plântulas sintomáticas (Figuras 15C e 15D). A respeito deste fato, Neergaard (1979), relata que os patógenos podem contaminar as sementes apenas superficialmente ou, colonizando os tecidos internos. Ainda de acordo com este autor, se os patógenos estiverem associados internamente, a chance de transmissão às plântulas é mais efetiva, porém, se a contaminação for externa, os danos serão nas fases iniciais do processo de germinação.

Dessa forma, entende-se que o fungo *Fusarium* spp. pode estar associado a semente de pupunheira de duas formas, aderido externamente à semente, ou localizado internamente na semente na forma de micélio. Estes dois modos de transmissão do patógeno para a plântula garantem a sobrevivência do patógeno até que ocorra a infecção, ocasionando posteriores danos em plântulas pós-emergidas (Figura 16A) e em plântulas já desenvolvidas (Figura 16D e E).

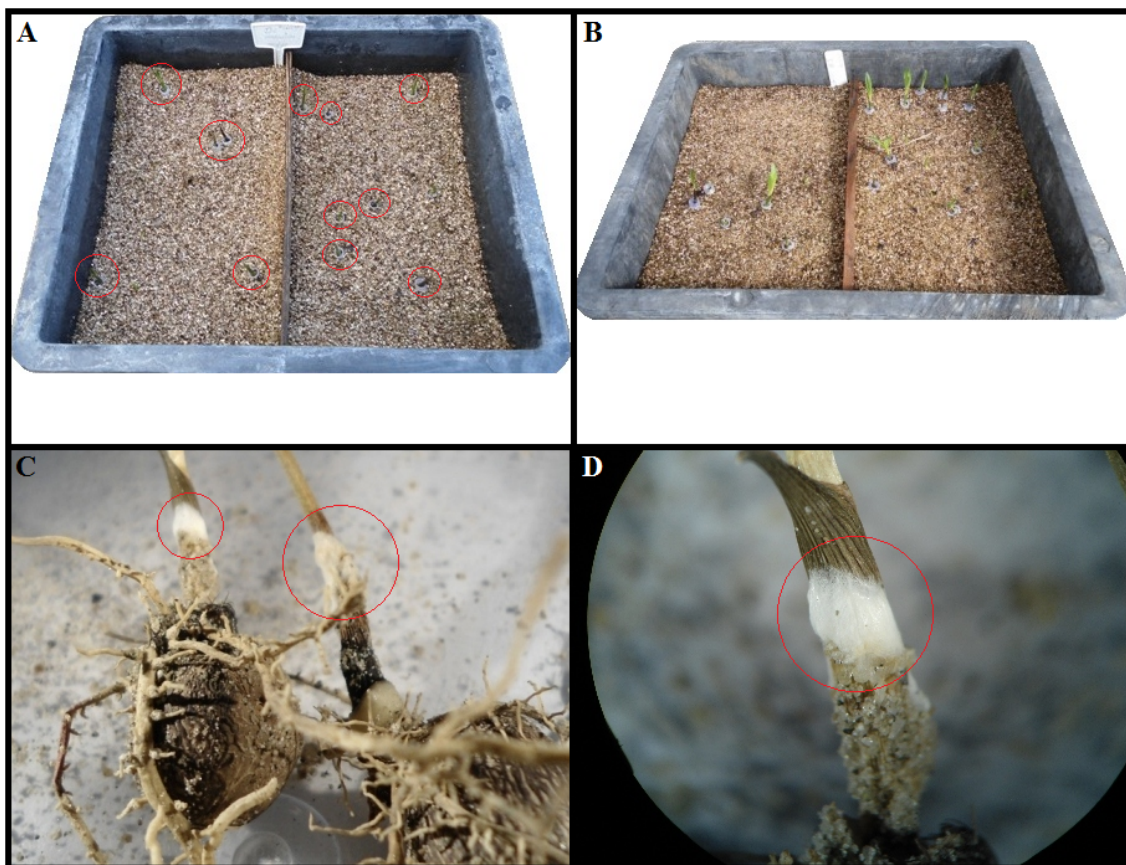


FIGURA 9. Plântulas emergidas em teste de transmissão. A e B: plântulas aos 100 dias após semeadura das sementes: A: lote 02E; B:lote VR1; C: Plântulas com sintomas da PBE e micélio de *Fusarium* spp. na região do colo; D: Detalhe do crescimento de micélio do fungo *Fusarium* spp.



FIGURA 10. Plântulas de pupunheira do teste de transmissão. A: Plântula com cerca de 90 dias pós-semeadura, exibindo sintomas da doença Podridão da base do estipe; B: corte transversal no colo da plântula sintomática exibindo danos internos (setas); C: corte transversal no colo de uma plântula sadia (setas); D: plântulas sintomáticas com cerca de 120 dias após semeaduras; E: plântulas ainda no substrato exibindo sintomas e sinais da doença (seta).

Qualidade Fisiológica de sementes de pupunheira

Teor de água

Os oito lotes avaliados apresentaram variações no teor de umidade (Tabela 7). No teste de comparação de médias, apenas o lote VR1 foi significativamente superior aos lotes 02D e 02A, enquanto que, os demais lotes apesar da variação não diferiram entre si.

O teor de umidade apresentou uma variação frequente entre lotes de sementes de pupunheira (Tabela 7). Há uma tendência para essa variação entre os lotes de sementes de pupunheira, corroborando com os dados de BOVI et al.,(2004). Estes autores, observaram que os lotes estudados também apresentaram qualidades fisiológicas distintas, com diferenças significativas de teor de água inicial, germinação e índice de velocidade de germinação. Sobre as causas desta variação, Bovi et al.,(2004) relatam que estas podem ser influenciadas pela colheita e manuseio das sementes, pelas condições agrobioclimáticas de cultivo e, possivelmente, componente genético.

TABELA 6. Médias dos teores de umidade em oito lotes comerciais de sementes de pupunheira oriundos da região de Porto Velho - RO.

Lotes	Teor de água (%)
VR1	46.49 a
T	43.96 ab
RECA	41.41 ab
02G	38.87 ab
01A	35.36 ab
02E	35.03 ab
02A	34.31 b
02D	34.07 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

De maneira geral, os valores obtidos para os lotes com teor de umidade abaixo de 35% (Tabela 7) poderiam ser considerados como um ponto crítico, abaixo do qual a viabilidade das sementes seria reduzida de forma não significativa, porém, substancialmente, gerando consideráveis quebras de stand em semeadura.

A germinação e emergência dos lotes avaliados em ensaios posteriores demonstraram que a umidade teve relevante importância para esta espécie, corroborando com os estudos realizados por Ferreira e Santos (1992). Estes autores afirmaram que a pupunheira é uma espécie recalcitrante, sendo que o teor de água das mesmas é um fator determinante. Os resultados obtidos demonstraram que, embora a redução da umidade de 45% para 38% não

tenha influenciado de maneira significativa a emergência, ao alcançar 30% houve queda acentuada da viabilidade das sementes resultando em baixa taxa de emergências das mesmas, enquadrando as sementes de pupunheira dentro do grupo das chamadas recalcitrantes.

Outros estudos relatam valores inferiores a faixa de teor de água crítico aos observados neste trabalho. Bovi et al. (2004), classificam as sementes de pupunheira como recalcitrantes, apresentando germinação inicial alta (59 a 84%), quando não sujeitas à desidratação (47 a 38% de umidade inicial) e reduções significativas na germinação e vigor, a partir de teores de umidade entre 28 e 23%. Farrant et al. (1988); Ellis et al. (1991); Martins et al. (1999ab); Bovi et al. (2004), enfatizam que há uma sensibilidade diferenciada na tolerância à perda de água entre ecótipos de diferentes origens dentro de uma mesma espécie.

Germinação

Na Tabela 8 verifica-se a superioridade quanto à germinação de sementes nos dois primeiros lotes (T e RECA) em relação aos demais, mas diferindo no teste de médias ($p < 0,05$) apenas dos lotes 02G; 02A; 02E; 01A, que por sua vez apresentaram maiores valores de incidência de sementes duras. O lote VR1 apresentou valores intermediários de percentagem de germinação, sendo o terceiro melhor lote com incidência de sementes germinadas, diferindo dos lotes 02E e 01A.

Em relação ao número de sementes mortas, o lote 02A obteve a maior média, diferindo significativamente do lote RECA, que não apresentou sementes mortas ao término do ensaio.

TABELA 8. Médias de percentagem de sementes germinadas, duras e mortas, plântulas normais e anormais (%).

Lotes	Germinação	Plântulas Normais	Plântulas Anormais	Sementes duras	Sementes Mortas
T	75 a	75 a	0	22 b	3 bc
RECA	74 a	74 a	0	26 b	0 c
VR1	66 ab	66 ab	0	26 b	8 abc
02D	53 abc	53 abc	0	40 b	7 abc
02G	48 bc	48 bc	0	47 a	5 abc
02A	46 bc	46 bc	0	41 a	13a
02E	43 c	43 c	0	46 a	11ab
01A	41 c	41 c	0	50 a	9 abc

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade. CV(%) = 17,33; 12,11; 57,4.

Na literatura consultada há divergências quanto a nomenclatura e interpretação de dados referentes aos atributos observados nos testes de germinação e emergência de sementes de pupunheira. Pizzinatto et al., citando Mora-Úrpi (1979), em trabalhos com germinação de

sementes de pupunheira, relatam com equivocada ambiguidade os testes de germinação e emergência, sem fazer o discernimento entre um e outro. Outros autores, Bovi et al. (2004), sugerem sutis modificações em relação ao teste convencional de Maguire (1962); porém, denominam o teste como de germinação, mesmo contabilizando apenas as plântulas emergidas, onde seria o mais adequado chamá-lo de teste de emergência.

O teste de emergência pode ser feito em canteiro, caixa ou saco plástico contendo algum tipo de substrato e mantido sob condições não controladas, onde, na ocasião de avaliação é observado apenas o surgimento de estruturas acima da linha do solo, a primeira ou segunda bainha plumular evidenciando a emergência da plântula.

Esta é a principal diferença em relação ao teste de germinação, que, mede em momento anterior a emergência, quando a semente já está diferenciada e emitindo seus primórdios radiculares; este momento antecede a visualização da estrutura acima do solo. Sabe-se que a maioria dos testes de germinação é feito em rolo de papel, conforme recomendação das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Porém, este não é um teste exequível em sementes de pupunheira devido a características fisiológicas e morfológicas da mesma. Desta forma deve optar-se por um substrato que favoreça a germinação das sementes, e fazer a verificação de estruturas iniciais como citadas em Ferreira (2005), como o pecíolo cotiledonar intumescido, e já exteriorizado chamado de botão germinativo.

O termo germinação pode estar associado a distintas interpretações. Segundo Pollock & Roos (1972) a germinação é a emergência da radícula através do tegumento. Já os tecnologistas de sementes caracterizam a germinação por um desenvolvimento estrutural da plântula, bem definido para cada espécie, que permita prever condições de desenvolvimento normal no campo (BEWLEY e BLACK, 1985).

O teste de germinação, além de servir como base para a comparação entre lotes de sementes para a comercialização e para a determinação da densidade de semeadura, tem a vantagem de ser altamente padronizado e de uso generalizado na avaliação da qualidade fisiológica da semente (BIANCHETTI, 1981b).

Emergência

O lote RECA seguido do lote T foram os primeiros a destacarem-se (Tabela 9) em relação aos demais, apresentando um maior número de plantas germinadas. De acordo com Moro (1999), sementes que germinam primeiro produzem mudas mais vigorosas que, quando transplantadas para o campo, continuam destacando-se pelo vigor e precocidade. Enquanto que, mudas de sementes que germinam tardiamente (após 120 dias) têm um crescimento bem mais lento no campo.

Como já era esperado o percentual de sementes germinadas foi menor em relação ao teste anterior sob condições controladas. Os lotes RECA e T novamente foram destaque, apresentando diferença significativa no teste de comparação de médias, sendo superiores aos lotes 02D; 02G; 02A; 02E e 01A, porém sem diferir entre si e do lote VR1 (Tabela 9). Nas sementes não germinadas submetidas a câmara úmida, foram detectados os seguintes fungos: *Fusarium* spp., *Trichoderma* sp., *Trichothecium* sp., *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. .

TABELA 9. Médias de percentagem de plântulas emergidas, normais e anormais, sementes duras e mortas (%).

LOTES	Emergência	Plântulas Normais	Plântulas Anormais	Sementes Duras	Sementes Mortas
T	48 a	48 a	19 ab	9 b	24 ab
RECA	42 ab	42 ab	25 a	15 ab	18 b
VR1	40 abc	40 abc	14 ab	15 ab	31 ab
02D	31 bcd	31 bcd	11 b	10 b	48 a
02G	25 cd	25 cd	15 ab	23 ab	37 ab
02A	22 cd	22 cd	20 ab	29 a	29 ab
02E	20 cd	20 cd	9 b	20 ab	51 a
01A	16 d	16 d	10 b	25 a	49 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade. CV(%) = 39,42; 14,89; 19,33; 35,63

As sementes retiradas após término do teste de emergência apresentavam diferentes estádios de desenvolvimento (Figura 17), indicando grande desuniformidade na germinação e emergência das mesmas.

Observou-se grande variação quanto ao número de sementes germinadas, emergidas, plântulas normais, anormais, sementes mortas e duras como evidenciado na Tabela 9. As plântulas anormais foram consideradas todas aquelas que ao término do período de avaliação ainda não haviam emergido a superfície, apresentando problemas no desenvolvimento.

Foram encontradas sementes em todos os estádios de desenvolvimento, desde plântulas que ainda não haviam emergido a superfície, com início da formação do botão germinativo,

formação inicial da lígula, e outras já emergidas, com lígula, plúmula ou primeira bainha já desenvolvidas. (Figura 17). Ainda nesta Figura, pode-se observar o contraste entre quatro lotes, os dois primeiros, lotes 01A e 02A com baixo número de sementes emergidas, e a grande maioria em seus estádios iniciais de desenvolvimento, corroborando com os dados de germinação em condições controladas, onde estas já haviam apresentados baixa germinação. Já os lotes T e VR1 obtiveram um maior número de sementes germinadas (estruturas iniciais) e emergidas, já ultrapassando a linha do solo, sendo de maneira geral superiores aos dois primeiros, com maior germinação e emergência.

O teste de emergência realizado em casa de vegetação não climatizada não possui controle dos fatores climáticos para com o material vegetal. Apesar de ser um teste válido e útil na verificação da qualidade de sementes, deve-se atentar para a sua interpretação a fim de evitar equívocos. Oliveira et al. (2009), relatam sobre as dificuldades nos testes realizados no campo, enfatizando a falta de padronização, devido as variação das condições climáticas.

Os dados obtidos neste trabalho sobre o teste de emergência corroboram com a literatura acerca de sementes de palmeiras, consideradas de germinação lenta e desigual (Meerow, 1991).

O número de plântulas normais ou fortes e vigorosas foi reduzido neste trabalho em relação ao ensaio anterior de germinação sob condições controladas, exceto o lote Reca. Os demais apresentaram elevado número de plântulas anormais, sendo o fator preponderante o baixo desenvolvimento das mesmas. Outro fato ocorrido foi o elevado número de sementes mortas (Tabela 9), em sua maioria em estágio de decomposição avançado.

Em estudos de germinação de sementes de pupunheira Ferreira e Santos (1992), relatam que a emergência das sementes de pupunheira teve início entre 50 e 60 dias após a semeadura, tendo alcançado sua estabilização entre 120 e 130 dias. Esses resultados concordam com os de Cardoso (1944) que observou um período de 100 a 150 dias para a semeadura em terra, apesar dos autores se referirem nos experimentos a um teste de germinação, estes podem ser comparados ao presente trabalho de emergência, pois foram considerados a emergência e realizados em casa de vegetação. O presente experimento teve emergência média dos lotes iniciada aos 69 dias, estabilizando aos 120 dias após semeadura.

O lote Reca teve a maior incidência plantas normais, o estágio com o "primeiro eófilo expandido" também conhecido como "primeira folha bífida expandida" que pode ser considerado como critério para caracterização da formação de uma "plântula normal". (FERREIRA, 2005). Houve diferença significativa entre os lotes quanto ao número de plântulas emergidas (Figura 17 A e B).

Vigor

Na Tabela 10 verifica-se que, corroborando com os dados obtidos para germinação e emergência no experimento anterior, os lotes T e Reca apresentaram maior velocidade de germinação, enquanto que os lotes 01A, 02E e 02A, permaneceram nas três últimas posições. Considera-se como maior velocidade de germinação as menores médias obtidas por lote, pois estas indicam que o mesmo levou menos dias para germinar. Quanto maior for o índice de velocidade de germinação, subentende-se maior velocidade de germinação, e consequentemente, maior vigor do lote, cujo índice calculado estima o número médio de plântulas normais por dia.

TABELA 10 - Médias do IVG e VG de os oito lotes comerciais de sementes de pupunheira.

LOTES	IVG ¹	VG ²
T	0,68 a	34,8 d
RECA	0,48 b	47,4 c
VR1	0,37 bc	56,3 abc
02D	0,28 cd	58,8 ab
02G	0,28 cd	51,8 bc
02A	0,25 cd	58,2 ab
02E	0,23 cd	63,3 a
01A	0,20 d	61,5 ab

¹ Índice de velocidade de germinação; ² Velocidade de germinação. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Como observado nos ensaios de germinação e emergência, os lotes T, VR1 e Reca apresentam-se mais vigorosos (Tabelas 8 e 9). De acordo com Marcos Filho et al. (1987), as sementes que germinam mais rapidamente, isto é, que apresentam maior porcentagem de plântulas normais nessa contagem, são consideradas mais vigorosas.

Com estes resultados pode-se inferir que os lotes T, Reca e VR1 são os mais vigorosos, entendido o vigor como o nível de energia que uma semente dispõe para realizar as tarefas do processo germinativo (CARVALHO, 1986).

Os índices de velocidade emergência (IVE), e velocidade de emergência (VE), apresentados na Tabela 11, permitiram observar certa inconformidade em relação aos valores de VE obtidos para os lotes 02G e 02D, sendo estes menores que dos lotes Reca e VR1; os quais até então nos ensaios anteriores mostraram-se superiores em seu vigor. Este fato por ser atribuído à baixa taxa de emergência dos lotes 02G e 02D, já demonstrada em ensaio anterior (Tabela 10). A pequena quantidade de sementes emergidas destes lotes ficou mais concentrada em um período menor em relação aos demais lotes, entre 68 e 108 dias após semeadura, apenas 40 dias de plena emergência. Como a VE estima o número de dias que as plântulas levam para

emergirem do solo, obtida através da equação já descrita anteriormente, onde o numerador é o produto do número de dias de avaliações após semeadura, pelo número de plântulas emergidas a cada avaliação (se este for zero, o valor será nulo, não sendo contabilizado, ou se houveram poucas avaliações com plântulas emergidas, resultará em um baixo valor para o numerador da equação), na sequência, onde este dividendo sofrerá uma divisão pelo denominador constituído do somatório do número de plântulas emergidas, este divisor da fração também influencia no resultado, pois quanto menor este valor, o quociente dessa divisão, no caso o VE, será maior.

TABELA 11. Médias de IVE e VE de oito lotes comerciais de sementes de pupunheira.

LOTES	IVE ¹	VE ²
T	0,065 a	69 d
RECA	0,056 ab	85 bc
VR1	0,042 bc	88 bc
O2G	0,034 cd	84 bc
O2D	0,028 cde	84 bc
O2E	0,021 de	100 a
01A	0,022 de	96 ab
02A	0,014 e	100 a

¹ Índice de velocidade de emergência; ² Velocidade de emergência. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Posto isto, em relação ao número de dias estimados que as plântulas levaram para emergirem do substrato (VE), verifica-se que o lote T apresentou ampla distribuição temporal da sua emergência em canteiro (alto valor do numerador), um tempo médio de emergência de 40 a 108 dias (68 dias), e somatório de plântulas emergidas (divisor) satisfatório, resultando em um VE equilibrado, porém designando certa desuniformidade na emergência do lote. Para o lote Reça, o quociente da equação de VE foi influenciado pela duração do tempo médio de emergência que durou dos 58 a 112 dias (54 dias), assim como para o lote VR1 com duração do tempo médio de emergência de 65 a 117 dias (52 dias).

Vale lembrar que entre as duas fórmulas (IVE e VE), alguns trabalhos (Nakagawa et al., 1983; Crocomo et al., 1989; Tsuboi, 1990) tem mostrado maior sensibilidade para IVE. Diante disto, adotou-se o procedimento relatado por Tsuboi (1990), que vislumbra outra possibilidade para a determinação do vigor relativo de lotes, baseando-se na velocidade de emergência de plântulas sem o emprego de fórmulas, elegendo um determinado dia, ou determinados dias, logo no início da emergência de plântulas, e realizar uma comparação de porcentagens de emergência de plântulas dos lotes naquele dia, considerando a média aritmética das repetições para cada lote. O lote que apresentar a maior porcentagem média neste dia definido, será o mais vigoroso, indicando que suas sementes, por serem mais vigorosas, apresentam maior rapidez de emergência e atingiram maior valor no dia escolhido.

Para tanto, considerando que ao longo do período de 120 dias foram realizadas 38 avaliações, desde o 35º dia, onde o primeiro lote começou a emergir, foram selecionadas três datas equidistantes neste período. Os valores médios em porcentagem foram: Reca: 8%; VR1 5%; T 5%; O2G 5%; O2D 3%; O2E 2%; O2A 2%; O1A 1%.

Através desse procedimento, pode-se evitar algumas interferências ou mascaramentos de resultados de velocidade de emergência de plântulas que as fórmulas possam trazer, como observado por Tsuboi (1990), em sementes de maracujá.

Outro ponto a ser considerado é a respeito de interferências externas, como a da temperatura, que mesmo o teste sendo realizado em época recomendada para a semeadura, podem ocorrer baixas temperaturas no transcorrer do teste, ocasionando um retardamento na emergência de plântulas. Tomer & Maguire (1990), trabalhando com trigo (*Triticum aestivum* L.), relataram a dificuldade de comparação de resultados entre testes, sendo esta, uma importante questão especialmente na região Sul do Brasil.

Patogenicidade e agressividade de isolados de *Fusarium* spp. obtidos a partir de sementes de pupunheira

No ensaio com três isolados inoculados por metodologia de injeção, os resultados evidenciaram que todos os três isolados foram patogênicos (Tabela 12).

As plantas inoculadas foram avaliadas durante 80 dias após a inoculação (DAI). Aos 42 DAI, o isolado SP5 já apresentava 100% de plantas sintomáticas, e aos 72 dias todas estas já estavam mortas, atingido nota 4 na escala descritiva para a respectiva doença. Enquanto que, o isolado 3A apresentou apenas aos 63 DAI sintomas em todas as plantas, porém com menor severidade. Já o isolado 1A, apresentou uma incidência de 80% de plantas sintomáticas aos 63 DAI, e apenas três plantas mortas ao final do experimento.

Todos os isolados diferiram da testemunha (Tabela 12), comprovando sua patogenicidade, enquanto que o isolado SP5 mostrou-se o mais agressivo (Figura18).

TABELA 12. Comparação das médias de incidência (%) e severidade da Podridão da Base do Estipe em mudas de pupunheira inoculadas com isolados de *Fusarium* spp.:

Isolados	Incidência	Severidade ¹
SP5	100 a	4,0 a
1A	80 b	2,3 b
3A	100 a	2,5 b
Testemunha	0 c	0 c

¹ Baseada em escala descritiva de notas (1 a 4) para a doença PBE Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a nível de 5 % de probabilidade.

As espécies de *Fusarium* spp. encontradas no presente trabalho foram: *F. oxysporum* (Tabela 13). Esta espécie já foi relatada em pupunheira por Pizzinatto et al.,(2001). As identificações foram realizadas pelo Prof. Dr. Dauri J. Tessmann (Universidade Estadual de Maringá).

TABELA 13. Isolados de *Fusarium* spp. utilizados nos ensaios, suas espécies e procedências:

Isolado	Procedência	Espécie
1A	Semente	<i>F. oxysporum</i>
3A	Semente	<i>Fusarium</i> sp.
SP3	Coleção Embrapa Floresta	<i>F. proliferatum</i>

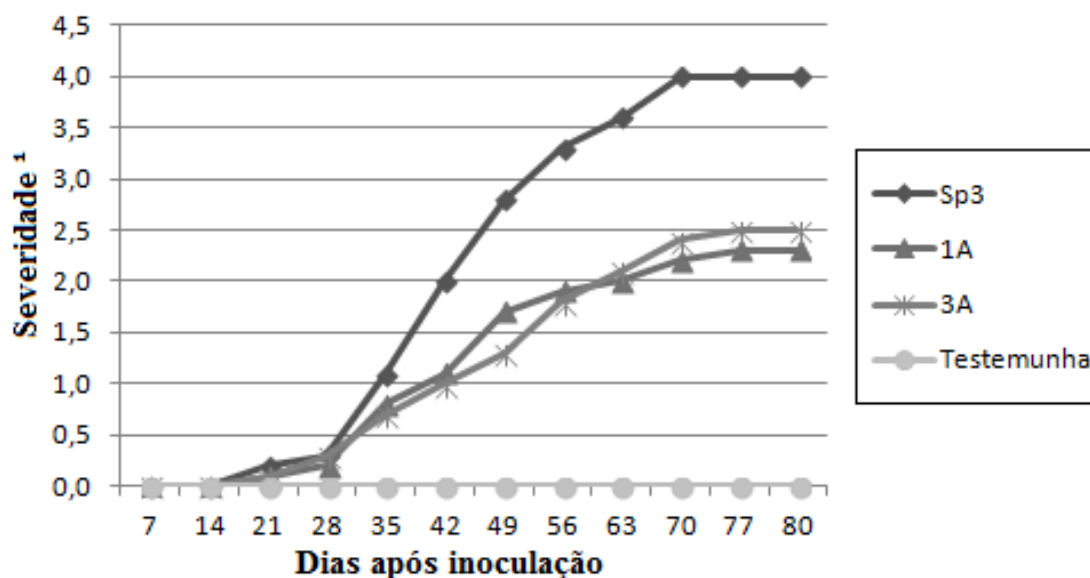


FIGURA 11. Severidade da podridão da base (PBE) do estipe em relação ao número de dias após inoculação de três isolados de *Fusarium* spp.; ¹ baseada na escala descritiva com notas (1 a 4) para a severidade da PBE.

Tratamento químico de sementes de pupunheira: efeito na sanidade, germinação e vigor

Avaliação da sanidade de sementes tratadas

O resultado do teste para controle químico de *Fusarium* spp. exibiu diferentes níveis de eficiência (Tabela 14). Todos os tratamentos com fungicidas controlaram *Fusarium* spp. em relação a testemunha (Tabela 14); porém, apenas os tratamentos clorotalonil + tiofanato metílico, e tiofanato metílico, foram estatisticamente superiores em relação a testemunha.

TABELA 14. Médias de incidência de *Fusarium* spp. para os seis tratamentos em que foram submetidas as sementes de pupunheira dos lotes 02E e VR1.

Tratamentos	Incidência de <i>Fusarium</i> spp.
Captana	3,5 ab
Clorotalonil + Tiofanato Metílico	0 b
Tiofanato Metílico	1,5 b
Captana + Tiofanato Metílico	4,5 ab
Hipoclorito de sódio.	7,0 ab
Testemunha	9,5 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Os lotes também apresentaram variações na incidência de *Fusarium* spp., sendo o lote VR1 significativamente mais contaminado do que o lote 02E. (Tabela 15).

TABELA 15. Médias de incidência de *Fusarium* spp. nos dois lotes (02E e VR1) de sementes de pupunheira submetidos ao teste de sanidade - Blotter test, após receberem seis tratamentos.

Lotes	Incidência de <i>Fusarium</i> spp.
02E	2,78 b
VR1	5,75 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Apesar de não diferir significativamente dos demais tratamentos com fungicidas, o tratamento com clorotalonil + tiofanato metílico foi o único a obter controle de 100% para *Fusarium* spp (Tabela 16).

TABELA 15. Médias de incidência de *Fusarium* spp. e outros fungos em dois lotes (02E e VR1) de sementes de pupunheira submetidas à seis tratamentos, porcentagem de controle em relação a testemunha sem tratamento químico.

Tratamentos	Incidência média de fungos (%)		Índice de Controle (%)	
	Outros fungos	<i>Fusarium</i>	Outros fungos	<i>Fusarium</i>
Captana	15,50	3,5	59,2	63,2
Clorotalonil + tiofanato Met.	5,00	0	86,8	100,0
Tiofanato metílico	4,50	1,5	88,2	84,2
Captana + tiofanato metílico	5,50	4,5	85,5	52,6
Hipoclorito de sódio.	23,50	7,0	38,2	26,3
Testemunha	38,00	9,5	-	-

O resultado do teste para controle químico de outros fungos (*Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Trichothecium* sp., *Rhizopus* sp. e *Helminthosporium* sp.) exibiu diferentes níveis de eficiência (Tabela 17). Todos os tratamentos com fungicidas diferiram da testemunha; porém, os tratamentos clorotalonil + tiofanato metílico, captana + tiofanato metílico e tiofanato metílico apresentaram maior eficiência de controle.

TABELA 16 Médias de incidência de outros fungos para os seis tratamentos em que foram submetidas as sementes de pupunheira dos lotes 02E e VR1.

Tratamentos	Incidência média de outros fungos (%)
Captana	15,50 bc
Clorotalonil + Tiofanato Metílico	5,00 c
Tiofanato Metílico	4,50 c
Captana + Tiofanato Metílico	5,50 c
Hipoclorito de sódio.	23,50 bc
Testemunha	38,00 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Os dois lotes apresentaram variações na incidência de outros fungos, sendo o lote 02E significativamente mais contaminado do que o lote VR1 (Tabela 15).

TABELA 17. Incidência média de outros fungos nos dois lotes de sementes de pupunheira.

LOTES	Médias
02E	18,86 a
VR1	12,33 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

A respeito do tratamento cinco, hipoclorito de sódio, sabe-se que é muito utilizado na desinfestação superficial de sementes; porém, Harmon e Pfleger (1974) relatam que este pode não eliminar fungos como *Aspergillus* e *Rhizopus* porque estes podem estar localizados na forma de micélio no tegumento e em outras partes mais internas da semente. Fato ocorrido no presente experimento, e não apenas com o hipoclorito, outros tratamentos também apresentaram contaminação fúngica persistente após o tratamento, inclusive para outros gêneros também encontrados. O aspecto visual das sementes tratadas no presente experimento (Figura 16) mostram claramente o grau de eficiência dos seis tratamentos no controle de *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira.

Acredita-se que a característica morfológica das sementes de contribua positivamente na sobrevivência dos fungos associados a esta, pois o endocarpo amarronzado ou preto que envolve a semente, unidade de dispersão (diásporo) chamada botanicamente de pirênio (Ferreira 2006), por ser dotada em sua superfície dorsal de fibras que atravessam longitudinalmente o propágulo, e concentram-se ao redor do poro por onde emerge a plântula, formando um tampão fibroso na base do poro germinativo. Sendo este local provável fonte de inóculo, abrigando diversos microrganismos.

O diásporo ainda pode contar com três poros: sendo dois estéreis, e sob o terceiro esta localizado o embrião (Figura 19F). Este endocarpo rugoso que envolve a semente pode ter dificultado o contato perfeito da solução fungicida com sua superfície da mesma.

A textura e a espessura do endocarpo desse diásporo podem justificar algumas hipóteses a serem testadas em trabalhos futuros, necessidade de maior tempo de exposição ao fungicida e testes com diferentes concentração.

Reforçando a hipótese de ineficiência por parte de alguns tratamentos em eliminar fungos localizados internamente na semente, foi encontrado o basidiomiceto da espécie *Schizophyllum commune* Fr. (Figura 20) nos lotes tratados com Captana, Tiofanato metílico, Clorotalonil + tiofanato metílico, o que indica que não houve controle eficaz dos patógenos internalizados na sementes, já que trata-se de um fungo endofítico. Este fungo já foi encontrado em sementes de dendezeiro por Bezerra e Oliveira (1984), causando infecção de sementes de dende (*Elaeis guineensis*). Em estudos acerca da durabilidade natural da madeira de pupunheira associados a fungos, Jesus e Abreu (2002), relatam a incidência deste basidiomiceto em madeira (tecido vascular primário) de pupunheira. Este pode ser mais um indício de contaminação das sementes na colheita e beneficiamento.

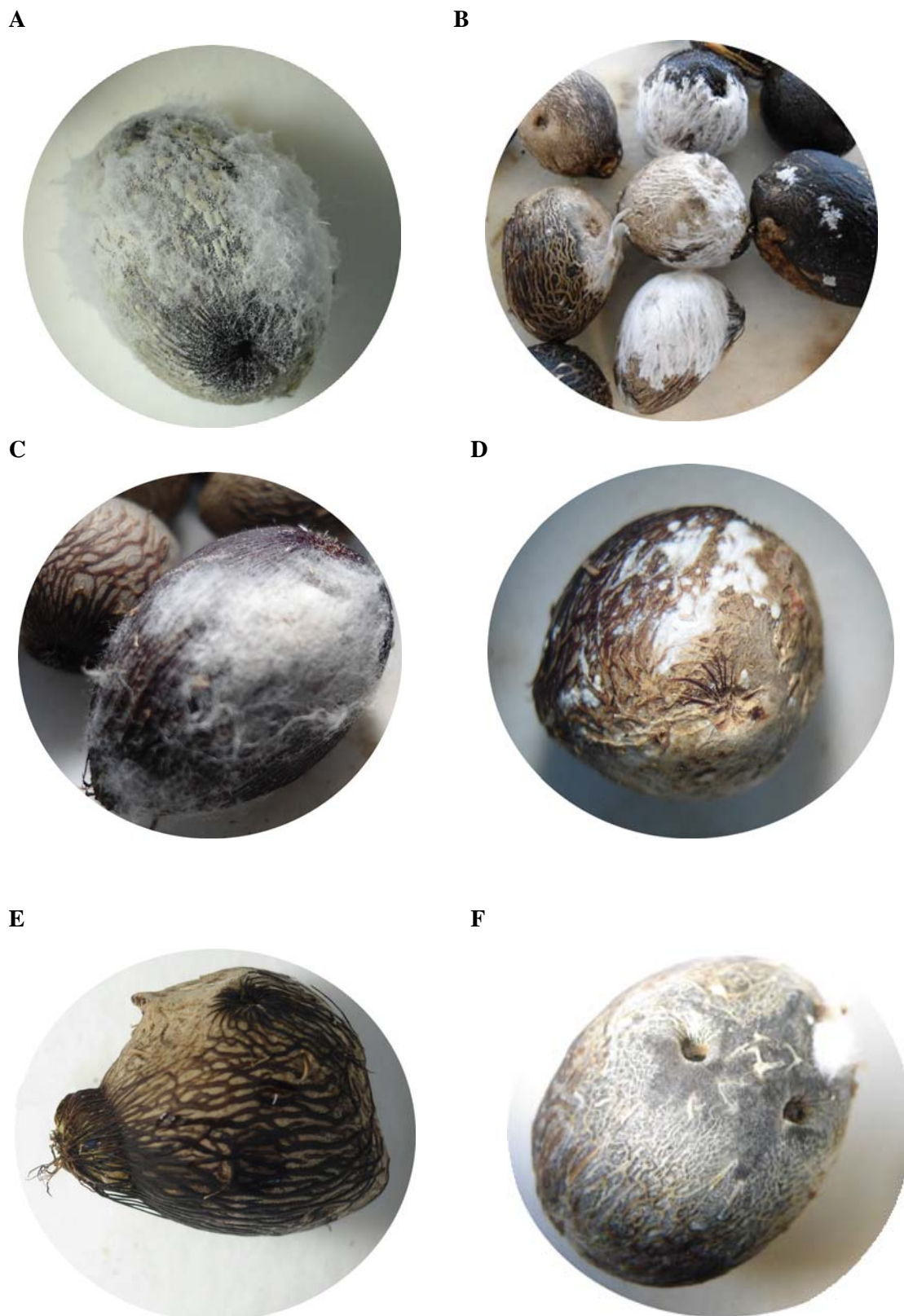


FIGURA 12. Sementes de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) para os seguintes tratamentos: **A:** Hipoclorito de sódio a 3%; **B:** Testemunha; **C:** Captana; **D:** Captana + Tiofanato metílico; **E:** Clorotalonil + tiofanato metílico; **F:** Tiofanato metílico.



FIGURA 13. Presença de *Schizophyllum commune* Fr. em sementes de pupunheira. **A, B:** lote 02E tratado com captana; **C, D:** 02E tratado com hipoclorito de sódio; **E,F:** lote VR1 tratado com tiofanato metílico.

Dados do experimento de sanidade anterior foram superiores aos obtidos no presente experimento. Para os dois lotes, 02E e VR1 as incidências de 4 e 7 % respectivamente. Houve uma redução da incidência deste fungo, que passou a 3% no lote VR1 no tratamento com tiofanato metílico, 3% e 2% para o lote 02E nos tratamentos com hipoclorito e captana.

respectivamente. Bovi et al. (1999), em estudos com tratamentos químicos de sementes de pupunheira e seus efeitos na germinação das mesmas, relatam o contraste entre dois fungicidas, a eficiência do fungicida Thiram, apresentando efeito positivo no controle de *Fusarium* spp., sem afetar a qualidade fisiologia das sementes. Enquanto que, o fungicida thiabendazole além de não controlar eficientemente os fungos presentes nas sementes, apresentou efeito tóxico sobre a pupunheira na germinação e vigor.

O trabalho de Coates- Beckford e Chung (1987), mostra a ineficiência no uso dos fungicidas benomyl e chlorothalonil, além de contribuírem para a inibição da germinação.

Germinação e Vigor das sementes tratadas

Os resultados obtidos para a germinação dos lotes tratados quimicamente foram inferiores quando comparados aos testes anteriores de germinação (Tabela 7).

Apenas o tratamento com o fungicida captana mostrou-se eficiente, para o lote VR1 houve um ligeiro decréscimo da porcentagem média de germinação, de 66% para 59 %, já no lote 02E de 43% houve acréscimo de 1% na germinação, quando comparados a suas respectivas taxas de germinação em ensaios anteriores (Tabela4).

O Índice de velocidade de germinação mostrou-se novamente como um parâmetro mais confiável para mensurar o vigor de sementes, para o tratamento com Captana este também apresentou valores superiores (Tabela 19), até mesmo superando os ensaios anteriores.

Considerando ainda que este experimento foi instalado três meses após o experimento anterior de germinação (item 2.2), a suposta redução no vigor valida a teoria da recalcitrância para esta espécie. O teor de água inicial dos dois lotes (Tabela 3), exibe um teor umidade médio de 46% para VR1, e de 35% para 02E. Isto pode explicar porque o lote VR1 manteve seu vigor, dado seu alto teor de água inicial; já o lote 02E apresentou alta variação do seu teor de umidade dentro de um mesmo lote, 41% na primeira repetição e 36,73% de umidade na segunda repetição.

Foram feitas análises separadas por lote em DIC, fatorial entre os dois lotes x seis tratamentos, e comparação de médias por Tukey 5% e Scott-Knott, porém não foi detectada diferença entre nenhum tratamento.

TABELA 19. Comparação de médias de incidência do Índice de Velocidade de Germinação (IVG) em sementes de pupunheira nos dois lotes tratados.

LOTES	Médias do IVG
VR1	0,21 a
02E	0,15 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

TABELA 20. Incidência de sementes de pupunheira germinadas para os seis tratamentos nos dois lotes de sementes.

Tratamento	Lotes	Germinação (%)
Tiofanato Metílico	VR1	48 b
Clorotalonil + Tiofanato metílico	VR1	45 b
Captana	VR1	59 a
Captana + Tiofanato metílico	VR1	49 b
Testemunha	VR1	41 b
Hipoclorito de sódio	VR1	44 c
Tiofanato Metílico	02E	35 c
Clorotalonil + Tiofanato metílico	02E	33 c
Captana	02E	44 b
Captana + Tiofanato metílico	02E	37 c
Testemunha	02E	34 c
Hipoclorito	02E	33 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

TABELA 21. Índice de Velocidade de germinação (IVG) e Velocidade de Germinação (VG) para os seis tratamentos nos dois lotes de sementes de pupunheira.

Tratamento	Lotes	IVG	VG
Captana	VR1	0,27 a	46,50 a
Tiofanato Metílico	VR1	0,25 a	40,44 a
Captana + Tiofanato metílico	VR1	0,19 a	40,28 a
Clorotalonil + Tiofanato metílico	VR1	0,19 a	41,35 a
Hipoclorito	VR1	0,18 a	41,37 a
Testemunha	VR1	0,16 a	40,19 a
Captana	02E	0,21 a	49,17 a
Tiofanato Metílico	02E	0,17 a	44,68 a
Clorotalonil + Tiofanato Metílico	02E	0,16 a	42,21 a
Captana + Tiofanato metílico	02E	0,14 a	43,36 a
Testemunha	02E	0,13 a	40,23 a
Hipoclorito	02E	0,13 a	42,00 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Conclusões

- 1) Dentre as metodologias testadas para detecção de *Fusarium* spp., o papel cartão mostrou-se mais eficaz na recuperação deste patógeno em sementes de pupunheira.
- 2) O fungo patogênico *Fusarium* spp. pode ser transmitido de sementes para plântulas;
- 3) A maioria dos isolados de *Fusarium* spp. oriundos das sementes foram patogênicos à pupunheira;
- 4) Apenas os fungicidas clorotalonil + tiofanato metílico e tiofanato metílico obtiveram controle efetivo do patógeno alvo *Fusarium* spp. em sementes de pupunheira;
- 5) Foi isolado dos lotes de sementes de pupunheira a seguinte espécie de *Fusarium* spp.: *Fusarium oxysporum*.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1987.
- ALVES, S. A. R.; SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J. Análise da patogenicidade de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* à pupunheira. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 3., 2004, Colombo. **Anais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 1 CD-ROM. (Embrapa Florestas. Documentos, 102).
- ALVES, S. A. R.; SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* associados com a podridão do estipe da pupunheira no Paraná. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 52, p. 133-140, jan./jun. 2006.
- ANDERSON, R. L. A new method for assessing contamination of slash and loblolly pine seeds by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 5, p. 452-453, 1986.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.
- BEACH, J. H. The reproductive biology of the peach or "pejibaye" palm (*Bactris gasipaes*) and a wild congener (*B.porschiana*) in the Atlantic lowlands of Costa Rica. **Principes**. Vol.28. No.3: pp.107-119, 1984.
- BEZERRA, J.L.; OLIVEIRA, D.P. *Schizophyllum commune* como agente patogênico em sementes de dendê (*Elaeis guineensis*) na Bahia. **Revista Theobroma**. Vol. 14 No. 1 pp. 73-74, 1984.
- BIANCHETTI, A.; AMARAL, E. Dia médio e velocidade de germinação de sementes de cebola (*Allium cepa* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, p.33-44, 1978.
- BIANCHETTI, A. Produção e tecnologia de sementes de essências florestais. Curitiba: EMBRAPA/URPCS, 1981 b. 22 p. (Documentos, 2).

BOVI, M.L. A.; FLORES, W. B.C.; SPIERING, S.H.; MARTINS, A.L.M.; PIZZINATTO, M.A.; LOURENÇÃO, A.L. Seed germination of progenies of *Bactris gasipaes*: percentage, speed and duration. **Acta Horticulture**, Wageningen, v. 360, p. 157-165, 1993.

BOVI, M.L.A. 1998b. Palmito pupunheira: informações básicas para cultivo. Instituto Agrônomo, Campinas, 1998b. 50 p. (**Boletim técnico**, 173).

BOVI, M.L.A.; MARTINS, C. C.; SPIERING, S. H. 2004. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeitos sobre a germinação e o vigor. **Horticultura Brasileira**. Vol. 22, p. 109-112.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395p.

CARDOSO, W. 1944. Sementeiras em serragem. **Boletim de Secção de Fomento Agrícola no estado do Pará**, 3(2):27-33.

CARVALHO, N.M. Vigor de sementes. In: CÍCERO, S.M.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R. (Ed.). *Semana de atualização em produção de sementes*, Piracicaba, 1986. p.207-223.

CONTI, J.B; FURLAN, S.A. 1998. Geoecologia: o clima, os solos e a biota. In: ROSS, J.L.S. (org.). *Geografia do Brasil*. 2ª Ed. – São Paulo: EDUSP. 1998.

COATES - BECKFORD, P.L.; CHUNG, P.C. A study of the germination, disease symptoms, and fungi associated with pejibaye seeds. **Seed Science and Technology**, Wageningen, v.15, n.1,p. 205-218, 1987.

COSTA NETO, P.Q. 2002. Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) e caracterização por marcadores moleculares. 2002. 86 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

COSTA, C. J.; MARCHI, E. C. S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. (Embrapa Cerrados. Documentos, 229).

COUTURIER, G.; CLEMENT, C.R.; VIANA, P. 1991. *Leptoglossus lonchoides* Allen (Heteroptera, Coreidae), causante de la caída de los frutos de *Bactris gasipaes* (Palmae) en la Amazonia central. *Turrialba*. Vol.41, (n.3). p. 293-298.

CROCOMO, W.B.; GUASSU, C.M.O.; NAKAGAWA, J. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de algodão, amendoim e feijão tratadas com inseticidas sistêmicos. **Cientifica**, São Paulo, v.17, n.1, p.157-67. 1989.

EDMOND, J. B.; DRAPALLA, W. J. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, 1958. Vol. 71, p. 428-443.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H.; SOETISNA, U. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. **Seed Science Research**, v.1, n.1, p.99-104, 1991.

ELLISON, D.; ELLISON, A. *Betrock's cultivated palms of the world*. Hollywood: Betrock Information Systems, 2001. 110 p.

FARRANT, J.M.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Recalcitrance – a current assessment. **Seed Science and Technology**, v.16, n.1, p.155-166, 1988.

FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. 1992. Viabilidade de sementes de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth.). **Acta Amazônica**, 22(3): 303-307.

FERREIRA, S.A.N. 2005. Pupunheira, *Bactris gasipaes* Kunth. In: Ferraz, I.D.K.; Camargo, J.L.C. (Eds) *Manual de Sementes da Amazônia*. Fascículo 5, 12p. INPA, Manaus, AM, Brasil.

HARMON, G.G.; PFLEGER, F.L. Pathogenicity and infection sites of *Aspergillus* species in stored seeds. **Phytopathology**, Saint Paul, v.64, n.10, p.1339-1344, 1974.

HOFER H, HANAGARTH W, GARCIA W, MARTIUS C, FRANKLIN E, ROMBKE J, BECK L, (2001) Structure and function of soil fauna communities in Amazonian anthropogenic and natural ecosystems. **Europe Journal of Soil Biology**. Vol.37. p. 229-235.

INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL (ISA). Biodiversidade na Amazônia Brasileira: avaliação e ações prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios. São Paulo: Estação Liberdade, 2001.

JESUS, M.A.; ABREU, R.L.S. Durabilidade natural da madeira de pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth). I. Fungos. **Acta Amazonica**, n.32. Vol.4. p 663-675. 2002.

KALIL FILHO, A. N.; SILVA, V. F. O.; KALIL, G. P. da C. Efeito do Tamanho e Peso das Sementes de Duas Progenies de pupunheira sobre a Germinação. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. Comunicado técnico, 217. 3 p.

KULCHETSCKI, L.; GARDINGO, J. R. Aspectos ecológicos, botânicos e morfológicos. In: KULCHETSCKI, L.; CAHIMSOHN, F. P.; GARDINGO, J. R. Palmito Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), Ponta Grossa, UEPG, p.148, 2001.

LAZAROTTO, M. 2010. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cedro e patogenicidade de *Rhizoctonia* spp. UFSM, RS, 90 p. (Tese mestrado).

LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: MENTEN, J. O. M. (Ed.). Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: Esalq, 1991. p. 276-298.

MACKAY, D.B. The measurement of viability. In: ROBERTS, E.H. ed. Viability of seeds. Syracuse University Press, 1972. p. 173-174. cap. 6.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for emergence and vigour. **Crop Science**, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. Avaliação da qualidade de sementes. Piracicaba: FEALQ, 1987. 230p.

MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M.L.A.; STANGUERLIM, H. Teores crítico e letal de água para sementes de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.1, p.125-132, 1999a.

MARTINS, C.C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M.L.A. Desiccation tolerance of four seedlots from *Euterpe edulis* Mart. **Seed Science and Technology**, v.28, n.1, p.1-13, 1999b.

MATHUR, S.B. Testing seeds of tropical species for seed-borne diseases. **Seed Science & Technology**, v.11, p.113-128, 1983.

MATTOS SOBRINHO, C. C., Internalização de sementes e mudas de pupunheira no estado da Bahia. I Simpósio Brasileiro da Pupunheira. Itabuna - BA, 2011.

MENTEN, J. O. M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: MENTEN, J. O. M. (Ed.). Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. Piracicaba: Esalq, 1991. p. 115-136.

MEEROW, A.W. 1991. Palm seed germination. *IFAS Cooperative Extension Bulletin*, 274:1-10.

MORO, J. R. Produção de palmito de pupunheira no nordeste do Brasil: variabilidade genética e desenvolvimento de cultivares. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. de O.; RAMOS, S. R.R. (Ed.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Não paginado.

MORA-URPÍ, J. Método práctico para germinación de semillas de pejibaye. Asociación Bananera Nacional, Costa Rica, v. 3, p. 1415, 1979.

MORA-URPÍ, J ; SOLÍS, E. M. Polinización en *Bactris gasipaes* H .B.K. (Palmae) . **Revista Biologia Tropical**. v.28, n.1, p.153-174, 1980.

MORA Urpí, J.; WEBER; J.C.; CLEMENT, C.R. 1997. Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth {Pupunheira}. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 20. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research - IPK, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI, Rome. 83p.

NAKAGAWA, J.; ALMEIDA, A.M.; DE MARCHI, MJ.; ROSOLEM, e.A. Estudo de testes para avaliar a qualidade fisiológica das sementes de amendoim. **Rev. Bras. Sementes**, Brasília, v.5, n.3, p.63-76. 1983.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no crescimento de plântulas. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. de. Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. p.2:1- 2:21.

NEERGAARD, P. Detection of seed-borne pathogens by culture tests. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 217-254, 1973.

NEEGAARD, P. Seed pathology. London: Mac Millan Press, 1979. v.1., 829 p.

OLIVEIRA, E.C.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. Propostas para a padronização de metodologias em análise de sementes florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 11, n. 1, p. 1-42, 1989.

OLIVEIRA, A. C. S. ; MARTINS, G. N. ; SLIVA, R. F. ; VIEIRA, H.D. . Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas.. *InterSciencePlace*, v. 2, p. 1, 2009

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; NOGUEIRA, E.S.; PEIXOTO, M.C. Estado da arte da pesquisa em tecnologia de sementes de espécies florestais da Mata Atlântica. In: PIÑA- RODRIGUES, F.C.M.; FREIRE, J.M.; LELES, P.S.S.; BREIER, T.B. (Org.). Parâmetros técnicos para produção de sementes florestais. Rede Mata Atlântica de Sementes Florestais. Seropédica: UFRRJ, 2007, p.105-1141.

PIZZINATTO, Maria Angélica; BOVI, Marilene Leão Alves; SOAVE, Jaciro; SPIERING, Sandra Heiden; BINOTTI, C S. Tratamento químico de sementes de pupunheira (*Bactris gasipaes*): efeitos na sanidade, germinação e vigor. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 42-47, 2000.

POLLOCK, M.B.; ROOS, E.E. Seed and seedling vigour. In: KOZLOWSKI, T.T. Seed biology. New York: Academic Press, 1972. v. 1. p.320-323.

RAHALKER, P. W.; NEERGAARD, D. P. Studies on aerofungin as seed treatment in controlling seed-borne fungal disease. *Hind Antibiot Bull*, n.11, p.163-165, 1969.

SANTOS, A. F dos; TESMANN, D. J.; VIDA, J. B.; NUNES, W. M. C. As doenças da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth): Antracnose e Podridão da Medula. Comunicado Técnico 63, 2001.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N.; FINATO, P. D.; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. Primeiro relato da podridão da estipe da pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 680-682, 2004a.

SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B.; NEVES, E. J. M.; KALIL FILHO, A. N.; MAFACIOLI, R. Doenças da pupunheira no Estado do Paraná. Colombo: Embrapa Florestas, 2004b. 4 p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 90).

SANTOS, A. F. dos ; TESSMANN, D. J. ; VIDA, J B ; SANTANA, D. L. Q. . Manejo Fitossanitário de Viveiros de Palmeiras para Palmito. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2007 (Circular Técnica).

SANTOS, A. F.; CORRÊA, C.; NEVES, E. J. M. (Ed.) Palmeiras para produção de palmito: juçara, pupunheira e palmeira real. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 190 p.

SANTOS, A. F. dos. Detecção de fitopatógenos em sementes de pupunheira e transmissão de *Fusarium* sp. para plântulas. Colombo: Embrapa Florestas, 2011. 3 p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 277).

SANTOS, A. F. Dos ; PARISI, J .J .D.; MENTEN, J.O.M. (eds). Patologia de Sementes Florestais. 1ed. Colombo: Embrapa Florestas, 2011, 236 p.

SILVA, V. L.; MÔRO, F. V.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MÔRO, J. R.; SILVA, B. M. S.; CHARLO, H. C. O. Morfologia e avaliação do crescimento inicial de plântulas de *Bactris gasipaes* Kunth. (arecaceae) em diferentes substratos. Rev. Bras. Frutic, vol.28, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 3, p. 477-480, Dezembro 2006

SIVIERO A; MENTEN JOM. 1995. Uso do método do palito para inoculação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em soja. **Summa Pytopathologica**. Jaguariúna, v.21, n:3-4, p. 259-260.

SOUSA, E. P.; SOARES, N. S.; OLIVEIRA, J. B. R.; CORDEIRO, S. A.; SILVA, M. L. Competitividade da produção de palmito de pupunha (*bactris gasipaes* kunth.) no Brasil. In: XLVII Congresso Brasileiro de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2009, Porto Alegre. Desenvolvimento rural e sistemas agroalimentares: os agronegócios no contexto de integração das nações. Brasília: SOBER, 2009.

PIZZINATO, M. A.; BOVI, M. L. A.; SPIERING, S. H.; BINOTTI, C. S. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 2, p. 263-268, 2001.

REIS, E.M., REIS, A.C., CASA, R.T. & BLUM, M.M.C. Comparison of methods to detect leaf and head blighting fungi in small grain seeds. **Summa Phytopathologica** 25:364-367. 1999.

TEMPE, J. de. Handbook on seed health testing:routine methods for determining the health condition of seed in the seed testing station. Proceeding of the International Seed Testing Association. v.35. nº1. 1970.

TOMER, R. P. S.; MAGUIRE, J. D. Seed vigour studies in wheat. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 18, p. 383.392, 1990.

TONET R. M.; FERREIRA, L. G. S.; OTOBONI, J. L. M. A. Cultura da Pupunha. Campinas: CATI, 1999. 44 p. (CATI. Boletim técnico, 237).

TSUBOI, H. Estudos da formação de mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). Botucatu, Faculdade de Ciencias Agronômicas - Campus de Botucatu-UNESP, 1990. 117p. (Dissertação de Mestrado).

VALE, Francisco Xavier Ribeiro Do ; JESUS JÚNIOR, Waldir Cintra de; ZAMBOLIM, Laércio (Ed.). Natureza das epidemias. In: Francisco Xavier Ribeiro do Vale; Waldir Cintra de Jesus Júnior; Laércio Zambolim. (Org.). Epidemiologia aplicada. 1 ed. Belo Horizonte - MG: Editora Perffil, 2004, v. 1, p. 35-38.

VERISSIMO et al. Biodiversidade na Amazônia Brasileira. São Paulo: ISA, IPAM, GTA, ISPN, IMAZON, CI., 2001. 540 p.

VERZIGNASSI JR; VIDA JB; GASPAROTTO F; CORTEZ GLS; LORENZETTI ER; FARIA GS; TESSMANN DJ; SEVERINO JJ. 2004. Método do palito para inoculação de *Didymella bryoniae* em melão nobre e pepino “japonês”. **Fitopatol. Bras.**, Brasília, v. 29 (suplemento), p. 154.

YUYAMA, K.; MESQUITA, S. M. S. Crescimento de mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*) transplantadas em diferentes estádios de plântula, substratos e volume de substrato. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 30, p. 515-520, 2000.

WAITE, B.H., 1953. Inoculation studies and natural infection of banana varieties with races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. Plant Disease Reporter 61, 15-19.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DOS SINTOMAS EXTERNOS E INTERNOS DA PODRIDÃO DA BASE DO ESTIPE EM PUPUNHEIRAS SUBMETIDAS A DIFERENTES MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE ISOLADOS AGRESSIVOS DE *FUSARIUM* spp.

RESUMO

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) vem sendo extensamente cultivada no Brasil para a produção de palmito. Esta atividade constitui uma importante alternativa agroecológica para diversificação e fonte de renda para sistemas de produção em várias regiões brasileiras. Porém, deve-se observar a ocorrência de diversos patógenos em mudas enviveiradas e em plantas adultas em condições de campo. Dentre esses patógenos, destaca-se o fungo *Fusarium* spp., agente causal da Podridão da Base do Estipe (PBE). Dada a escassez de trabalhos já realizados sobre a inoculação de *Fusarium* spp. em pupunheira, este trabalho teve como objetivos: 1) Avaliar a eficiência de diferentes métodos de inoculação de *Fusarium* spp. em mudas de pupunheira; 2) Avaliar a patogenicidade e a agressividade de isolados de *Fusarium* spp.; 3) Caracterizar a evolução dos sintomas internos e externos da PBE em pupunheira inoculadas com *Fusarium* spp.; 4) Desenvolver uma escala descritiva para avaliação da severidade da PBE em mudas de pupunheira inoculadas por *Fusarium* spp. A inoculação das mudas de pupunheira foi realizada em plantas com três idades: plântulas de 4 meses e mudas de 6 e 8 meses. Grande variação na agressividade foi observada entre os isolados de *Fusarium* spp..A injeção de suspensão e imersão de raízes em suspensão de conídios, foram os métodos mais eficientes de inoculação de *Fusarium* spp., sendo este último o mais adequado para plantas de pupunheira mais novas, com 4 meses de idade. A escala descritiva para PBE permitiu a quantificação e descrição dos sintomas, sendo representados em uma escala de notas de 0 a 4.

Palavras-chave: epidemiologia; palmito; sintomatologia.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF EXTERNAL AND INTERNAL SYMPTOMS OF BASAL STEM ROTTING IN PEACH PALM UNDER DIFFERENT INOCULATION METHODS OF AGGRESSIVE ISOLATED OF *FUSARIUM* spp.

The peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) has been extensively cultivated in Brazil for producing palm heart. The peach palm farming is an important agroecological alternative for diversification and income source for production systems in many Brazilian regions. Varied pathogen occurrence is observed in seedlings from plant nurseries and in adult plants. Among those pathogens, stands out the *Fusarium* spp. fungus, which is causal agent for Basal stem rotting (BSR), a disease which causes necrosis on the stem, yellowish leaves and even the death of the plant, both in plant nurseries and the fields. Since there are not many studies on *Fusarium* spp. inoculation in peach palms, this study aimed to: 1) characterize the symptomatic evolution of BSR disease in peach palm inoculated with *Fusarium* spp.; 2) developing a descriptive scale for evaluating BSR severity in peach palm seedlings caused by *Fusarium* spp.; 3) evaluating the aggressiveness of *Fusarium* spp. isolates; 4) developing a methodology for inoculating *Fusarium* spp. in peach palm seedlings. In order to do so, four different methods were tested: a) a method for injecting a conidia suspension of *Fusarium* spp.; b) insertion of pathogen infested toothpicks; c) substitution of the bark for culture disk with *Fusarium* spp. mycelium; d) immersion of pruned root in a conidia suspension of *Fusarium* spp. For inoculating peach palm seedlings, plants of three ages were used: 4, 6 and 8-month-old seedlings. There was great variation on the aggressiveness of the evaluated *Fusarium* spp. isolates. The inoculation of *Fusarium* spp. was more efficient with the methods of suspension injection and root immersion in conidia suspension, the latter being more suitable for younger peach palm plants, such as 4 months old. The descriptive scale for BSR in peach palms allowed to quantify the disease.

Additional keywords: epidemiology; palm heart; symptomatology.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e consumidor de palmito do mundo. Estima-se que aproximadamente 90% do palmito comercial brasileiro, ou seja, cerca de 70 mil toneladas, procedam do extrativismo oriundo, principalmente, do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). Neste contexto, o cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth var. *gasipaes* Henderson) torna-se uma importante alternativa agroecológica para diversificação e fonte de renda para sistemas de produção em várias regiões brasileiras (SANTOS et al., 2003).

A pupunheira vem sendo extensamente cultivada no Brasil para a produção de palmito. É observada a ocorrência de diversos patógenos em mudas enviveiradas e em plantas adultas. Dentre esses patógenos temos o fungo *Fusarium* spp., agente causal da podridão da base do estipe (PBE), enfermidade que ocasiona necrose no colo, amarelecimento de folhas e morte de plantas, tanto em viveiro como em campo (PIZZINATTO, 2001) e (SANTOS et al., 2011).

Frente a escassez de trabalhos sobre a inoculação de *Fusarium* spp. em pupunheira, Alves et al. (2006), inocularam mudas de pupunheira com o auxílio de um furador, fazendo um furo circular de 7 mm de diâmetro no caule, na região do colo, em plantas com 10 meses de idade. Este método quando utilizado por Fuzitani (2012), para inocular mudas de pupunheira com *Phytophthora palmivora*, apresentou morte de 15% das plantas do tratamento testemunha. No mesmo trabalho o autor avaliou a metodologia de imersão da extremidade de raízes em suspensão de zoósporos de *P. palmivora* e a injeção de uma suspensão de zoósporos de *P. palmivora* na base do estipe. Pizzinatto et al., (2001) inocularam, com sucesso, mudas de pupunheira com 45 dias de idade, com *Fusarium* spp., depositando sementes de trigo colonizadas com o fungo no substrato próximo a um ponto previamente injuriado no colo da planta.

Diferentes métodos de inoculação vêm sendo utilizados em outros patossistemas, o método de inoculação por palito foi utilizado por Verzignassi et al. (2004), já testada anteriormente por Siviero & Menten (1995), que consiste no uso de um palito de dente colonizado com o micélio do fungo a ser espetado no colo da planta de milho, mostrando-se eficiente por apresentar menor custo, maior facilidade e rapidez, em relação aos outros métodos de inoculação.

Em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), Cavalcanti (2002), obteve sucesso quando inoculou raízes podadas em suspensão na concentração de 1×10^6 conídios/mL de *Fusarium oxysporum*. Esta metodologia também foi utilizada por Castro (2008), para inocular *F. oxysporum* f.sp. *cubense* em helicônia (*Heliconia* spp.), e que anteriormente, já havia sido descrita e avaliada por Waite (1953). Geralmente, o método mais utilizado é o “dipping” ou imersão de raízes em suspensão de inóculo do fungo à 1×10^6 conídios/mL (CASTRO 2007).

Dada à ampla variabilidade de espécies de *Fusarium* patogênicos com diferentes níveis de agressividade, somado a inexistência de métodos adequados de inoculação de *Fusarium* spp. em plantas de pupunheira, este trabalho objetivou: a) caracterizar a evolução sintomatológica da PBE em pupunheira; b) desenvolver uma escala descritiva para avaliar a severidade da PBE; c) desenvolver e testar uma metodologia de inoculação de *Fusarium* spp. em pupunheira; e) avaliar a agressividade e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. obtidos de sementes de plântulas de pupunheira.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no laboratório e casa de vegetação da Patologia Florestal na Embrapa Florestas, em Colombo – PR, no período de dezembro de 2011 a dezembro de 2012. Para atender os objetivos propostos, cinco experimentos compostos de 11 ensaios foram desenvolvidos no período de dezembro de 2011 a novembro de 2012.

O material vegetal utilizado nestes experimentos foram mudas de pupunheira cedidas pelo viveiro Flora do Vale, localizado em Garuva - SC. As mudas encontravam-se em três idades: a) mudas com 8 meses de idade, 30 cm de altura e 3-4 pares de folhas em sacos de polietileno preto (11 cm de altura e 7 cm de largura), tendo como substrato de terra de subsolo (Figura 1 C); b) mudas com 6 meses de idade mantidas em tubetes de 140 mm x 38mm com o mesmo substrato anterior (Figura 1B); e c) plântulas de 4 meses após semeadura com raiz nua (Figura 1A).

1.0. Preparo do Inóculo

1.1. Isolamento de *Fusarium* spp. e produção do inóculo

Para o presente estudo isolados de *Fusarium* spp. foram obtidos a partir da coleção do laboratório de Patologia da Embrapa Florestas, Colombo - PR. Os isolados foram mantidos por meio de repicagens periódicas em meio de batata-dextrose-ágar (BDA, e pelo método de Castellani (1939). As culturas fúngicas foram cultivadas em meio BDA, a 24 °C, por dez dias, no escuro.

Outros isolados foram provenientes do isolamento de mudas de pupunheira com sintomas da PBE (Figura 2), recebidas no laboratório de Patotologia Florestal da Embrapa Florestas para diagnose.

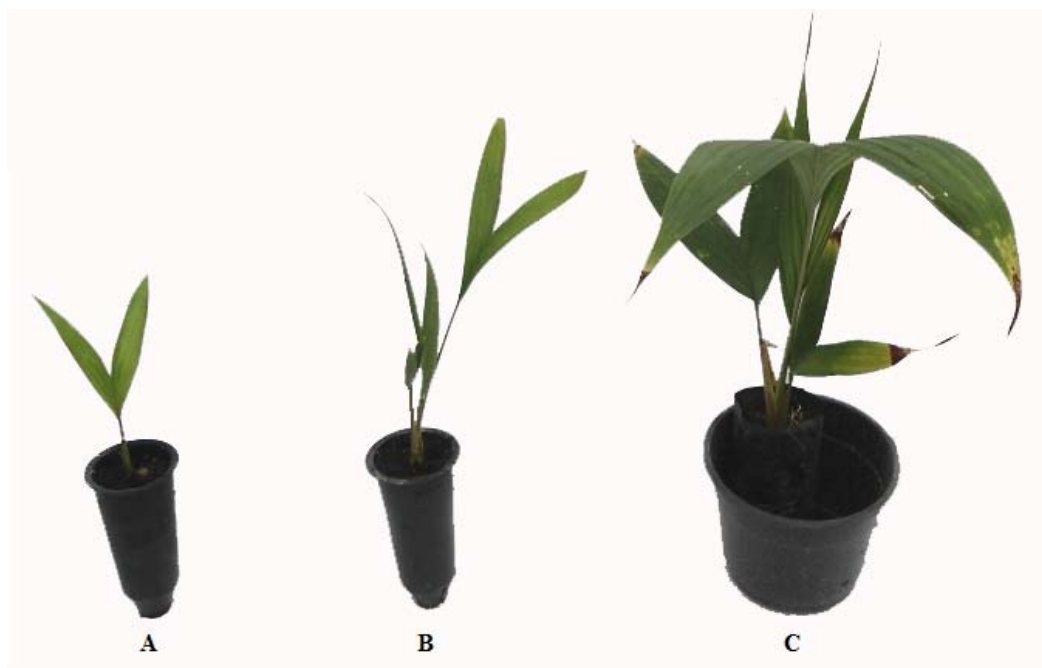


FIGURA 1. Pupunheira em diferentes estádios fenológicos e idades. **A:** Plântulas com 4 meses de idade; **B:** Mudas com 6 meses de idade; **C:** Mudas com 8 meses de idade.

Procedeu-se o isolamento de *Fusarium* spp. retirando-se fragmentos do colo da planta, da região entre o tecido sadio e o infectado, com posterior imersão em álcool a 70 % por um minuto, e em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5 % por um minuto. A seguir, os fragmentos de tecido foram lavados em água esterilizada. Este material foi, então, colocado em placas de Petri contendo meio BDA suplementado com ampicilina (80 ppm) e cloranfenicol (40 ppm), e transferido para BOD a 24 °C, até o aparecimento de colônias de *Fusarium* spp.

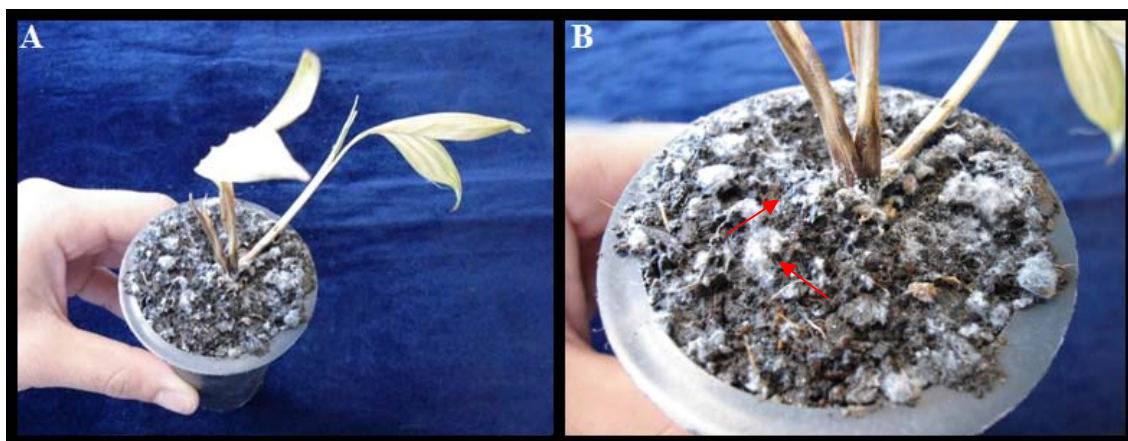


FIGURA 2. **A:** Muda de pupunheira com sintomas da PBE **B:** sinais do patógeno, detalhe do crescimento micelial abundante de *Fusarium* spp. na base da planta e no substrato (setas).

2. Métodos de inoculação

Quatro métodos de inoculação de *Fusarium* spp. foram testados em plantas de pupunheira em diferentes estádios fenológicos e idades para avaliação da PBE.

2.1. Injeção de suspensão de conídios: Utilizou-se uma seringa descartável com agulha hipodérmica nas dimensões de 1,20 x 40 mm para fazer uma incisão na base do colo da planta previamente desinfestado (Figura 3A) com álcool 70%. Neste ponto, injetou-se uma alíquota de 0,1 mL da suspensão de conídios por planta. Na testemunha injetou-se 0,1 mL de água destilada esterilizada.

2.2. Inserção de palito infestado com micélio de *Fusarium* spp.: Para este método foram utilizados palitos de dente cortados em quatro partes (Figura 4A), tomando-se a parte mais afilada que possuía cerca de 13 mm de comprimento. Os palitos foram previamente autoclavados a ± 130 °C durante 30 minutos. Os palitos foram espetados em placas de Petri contendo meio BDA (Figura 4B) com micélio em crescimento ativo do fungo *Fusarium* spp., penetrando no meio de cultura de forma que suas pontas ficassem aparentes. As culturas foram mantidas por dez dias incubados em BOD a 24 °C. No ato da inoculação, a região da planta a ser inserida o palito infestado foi previamente desinfestada com álcool 70%. Fez-se uso de uma agulha esterilizada para abrir um pequeno orifício a fim de facilitar a introdução do palito infestado na base do colo da planta. Este palito permaneceu na planta até a avaliação.

2.3. Substituição de disco da casca por disco de micélio de *Fusarium* spp.: Com o auxílio de um furador, fez-se um furo circular de 7 mm de diâmetro no caule, na região do colo da planta, que foi previamente desinfestada com álcool 70%. A casca foi retirada e substituída por um disco com o mesmo diâmetro de meio de cultura contendo micélio do fungo (Figura 5), cultivado em BDA por 10 dias. A face do disco correspondente a colônia do patógeno foi colocada em contato com a parte central interna do orifício. A seguir, vedou-se cada ponto de inoculação com filme plástico.

2.4. Imersão de raízes podadas em suspensão de conídios: Com o auxílio de uma pipeta volumétrica colocou-se 5 mL de água destilada esterilizada por placa de Petri contendo colônias de *Fusarium* spp. cultivadas em BDA, a 24 °C por 10 dias (Figura 7A), procedendo-se uma raspagem da superfície das colônias fúngicas (Figura 7B). As suspensões obtidas em cada placa foram vertidas para um béquer (Figura 7C), reservando-se uma amostra para a determinação da concentração, em câmara de Neubauer (Figura 7D). Após determinação da concentração da suspensão, as mudas com suas raízes já destorroadas e lavadas para retirada de fragmentos do substrato (Figura 6). As raízes foram podadas, a fim de servir como porta de entrada do patógeno na planta. A seguir foi realizada a imersão das raízes podadas na suspensão de conídios por tempo determinado conforme o ensaio.

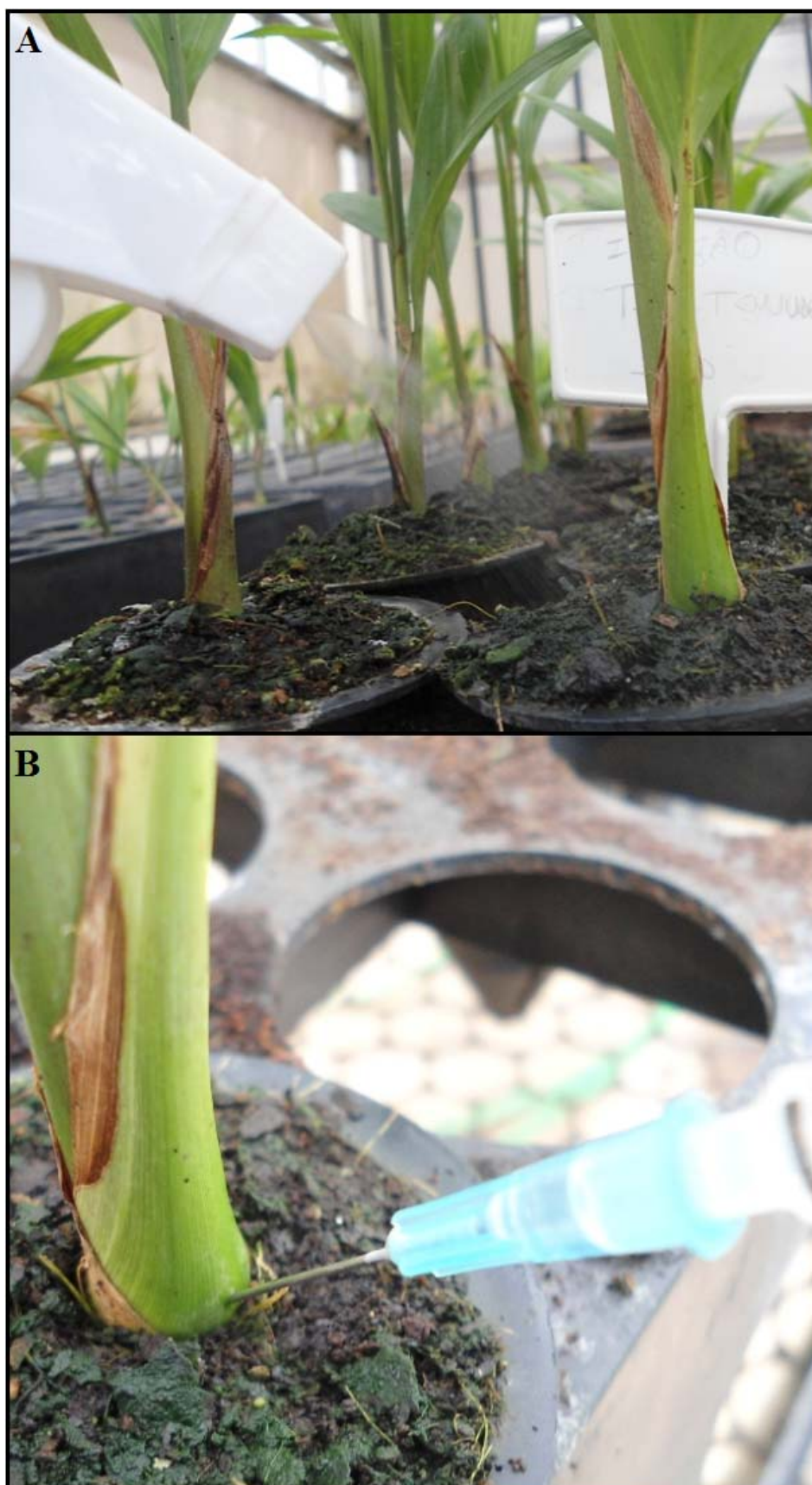


FIGURA 3. Método de injeção de suspensão de conídios. **A:** Desinfestação superficial da região de inoculação com álcool 70% ; **B:** injeção de suspensão conídios no colo da planta com agulha e seringa.

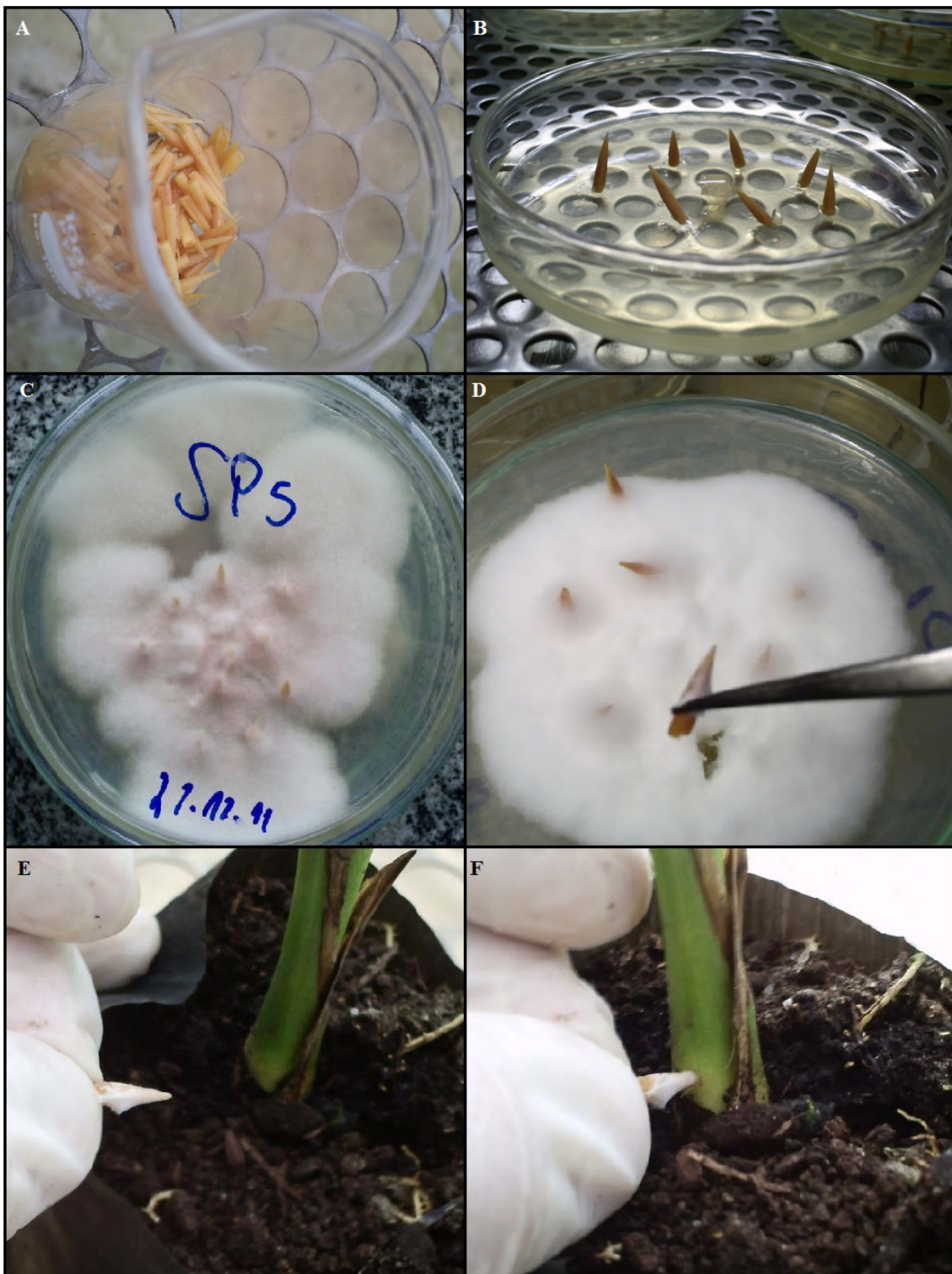


FIGURA 4. Metodologia de inoculação por palito. **A:** palitos esterilizados; **B:** Palitos dispostos na placa contendo meio de cultura e fragmento de micélio do fungo antes da incubação do material; **C:** placa colonizada após incubação do material; **D:** retirada do palito da placa; **E:** Palito infestado com micélio do fungo; **F:** introdução do palito de dente infestado com micélio de *Fusarium* spp. no colo da planta.



FIGURA 5. Método de inoculação pela substituição de disco da casca por disco de micélio de *Fusarium* spp. **A:** Furador com 7 mm de diâmetro; **B:** placa de Petri colonizada com *Fusarium* spp. utilizada para retirada de discos de meio contendo micélio fúngico; **C:** Disco de meio com sua face contendo micélio inserido na parte interna do orifício deixado pelo furador; **D:** ponto de inoculação vedado com filme plástico.

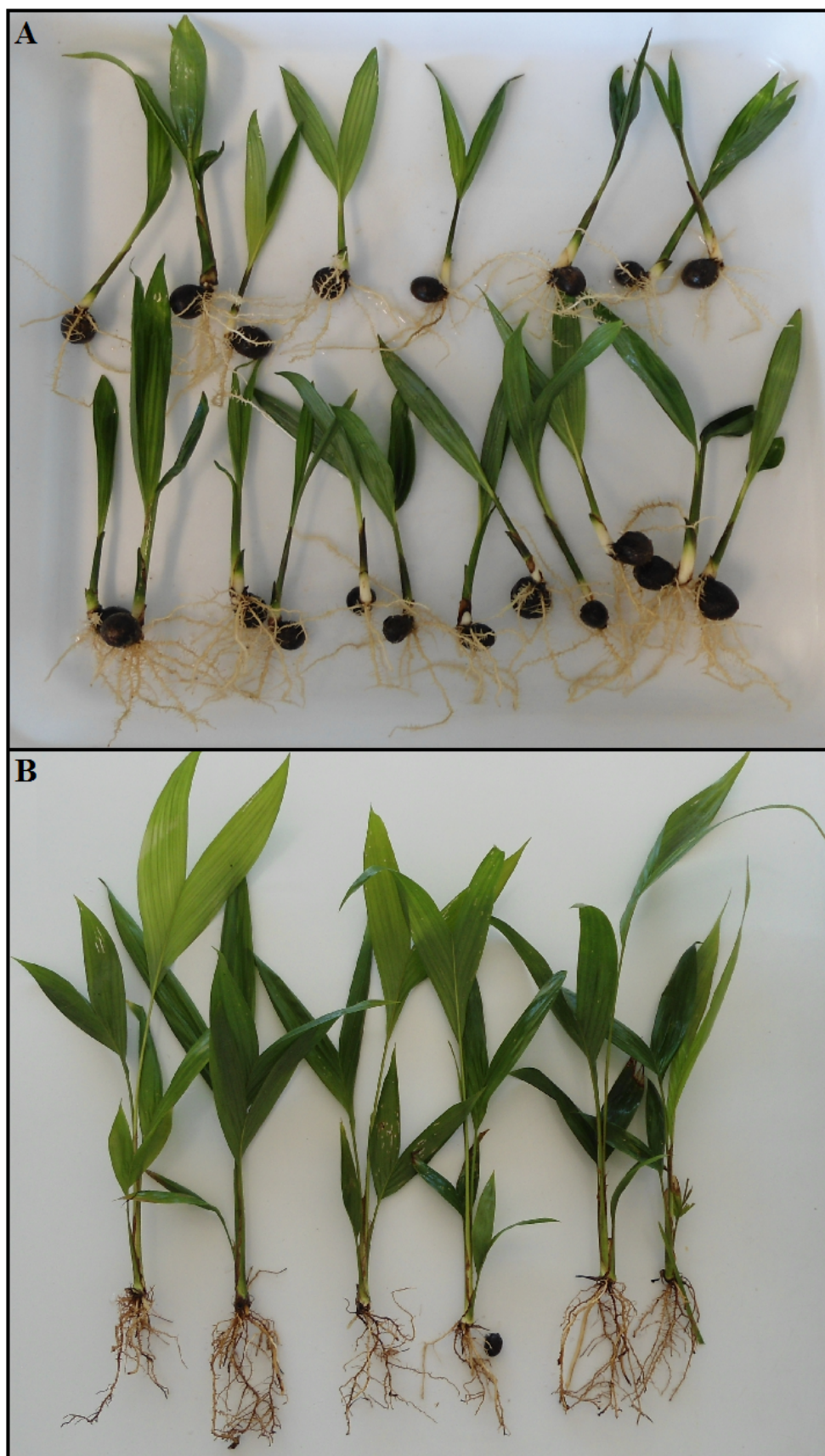


FIGURA 6. Plantas de pupunheira utilizadas na metodologia de imersão de raízes podadas em suspensão de conídios. **A:** plântulas de pupunheira com 4 meses de idade e raiz nua podada; **B:** mudas de pupunheira com 8 meses de idade, destorroadas e com raízes podadas.

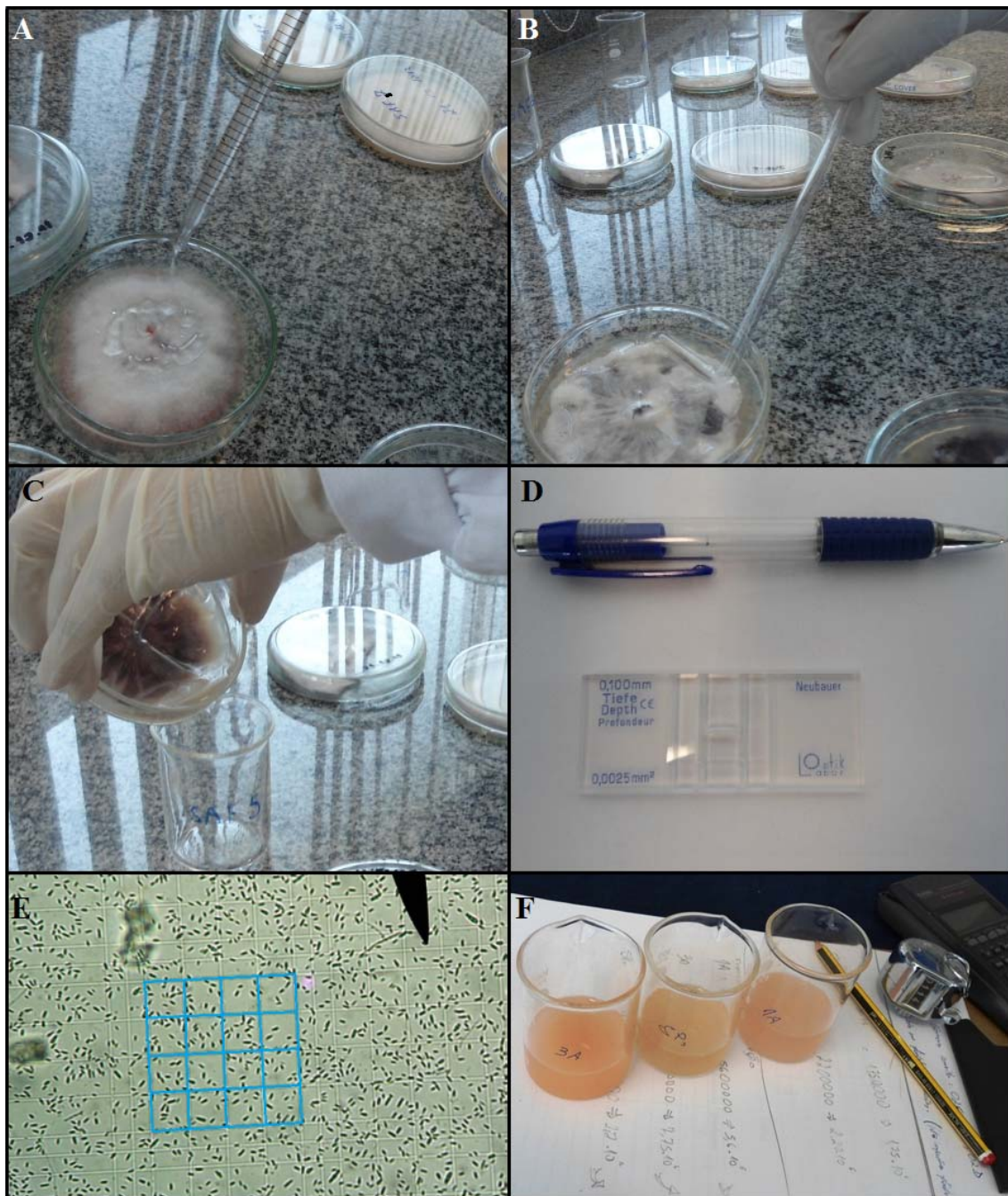


FIGURA 7 . Procedimentos para o preparo da suspensão de conídios de *Fusarium* spp.. **A:** adição de 5mL de água destilada esterilizada com auxílio de uma pipeta; **B:** raspagem da placa com auxílio de uma alça de Drigalsky; **C:** suspensão vertida em béquer; **D:** câmara de Neubauer utilizada na contagem de conídios; **E:** vista da câmara de Neubauer em microscópio óptico para contagem de conídios/mL; **F:** ajuste da concentração para padronização da suspensão de conídios de *Fusarium* spp a ser utilizada na inoculação.

Experimento I

Desenvolvimento de métodos de inoculação de *Fusarium* spp. em pupunheira

Foram realizados sete experimentos com a finalidade de testar quatro métodos de inoculação de *Fusarium* spp. em mudas de pupunheira. Para atingir o objetivo proposto de desenvolvimento de um método eficaz de inoculação, os seguintes ensaios foram avaliados: a) comparação de três métodos de inoculação; b) inoculação por injeção em quatro pontos no colo da planta; c) inoculação por imersão da raiz em suspensão de conídios; d) comparação entre quatro diferentes métodos de inoculação; e) inoculação por injeção com dois pontos no colo da planta; f) comparação de diferentes idades na metodologia de imersão de raízes na suspensão de conídios; g) estudo de concentração de conídios para inoculação por imersão e injeção.

a) Comparação de três métodos de inoculação

Este ensaio utilizou três métodos de inoculação de *Fusarium* sp. em mudas de pupunheira: Para tanto, adotou-se os métodos de inoculação com injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* spp., palito de dente infestado com micélio deste fungo e substituição da casca por disco de micélio do fungo.

Utilizou-se o isolado SAF2, pertencente a coleção de fungos do laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas. Foram avaliadas a cada sete dias a incidência e a severidade da PBE em mudas de pupunheira inoculadas.

Os tratamentos foram constituídos por três métodos de inoculação, dispostos em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento. Os dados relativos à incidência e severidade de mudas com sintomas foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para todos os ensaios realizados a severidade foi obtida com base em escala descritiva de notas desenvolvida para sintomas da PBE, exibindo valores entre 0 a 4.

b) Inoculação por injeção em quatro pontos no colo da planta

Neste experimento de inoculação utilizou-se metodologia de injeção descrita no item 2.1, com ligeiras modificações. Foram testadas variações quanto ao número de furos para injeção da suspensão de conídios de *Fusarium* sp. no colo da planta. Para isso, injetou-se um a quatro pontos de inoculação por planta (Figura 9). Foram avaliadas a cada sete dias após a inoculação, a incidência e a severidade da PBE em mudas de pupunheira.

Os tratamentos foram compostos pelo número de pontos feitos para injeção no colo da muda, resultando em quatro tratamentos, dispostos em delineamento inteiramente casualizado

com dez repetições por tratamento. Os dados relativos à incidência e severidade obtidos para os tratamentos com plantas sintomáticas, foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



FIGURA 8. Representação gráfica de muda de pupunheira inoculada pelo método de injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* spp., com setas sinalizando os respectivos locais de cada ponto de injeção.

d) Inoculação por imersão da raiz em suspensão de conídios de *Fusarium* sp.

O presente ensaio consistiu em testar outro método de inoculação, o método de inoculação por imersão de raízes podadas em suspensão de conídios de *Fusarium* spp.. Foram testados três intervalos de tempo: 30, 60 e 120 minutos de imersão. Para isso, foram destorroadas, lavadas, podadas (Figura 7) e imergidas conforme o tempo a ser avaliado, em uma suspensão de conídios de concentração já previamente determinada. Após esse período a planta foi transplantada para um vaso com substrato autoclavado.

Os isolados SP3 e SP5 foram utilizados, pois apresentaram ao final dos ensaios anteriores os melhores resultados em relação à agressividade. A concentração de conídios utilizada foi ajustada para $3,25 \times 10^6$ conídios/ mL. Avaliou-se a incidência e a severidade da PBE a cada sete dias após a inoculação.

Os tratamentos foram constituídos pelos três intervalos de tempo de imersão das raízes, dispostas em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições. Os dados relativos à incidência e severidade de mudas com sintomas obtidos para os tratamentos, foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

d) Comparação entre quatro métodos de inoculação

Neste ensaio, foram utilizados quatro métodos de inoculação: inoculação com injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* spp., palitode dente infestado com micélio deste fungo, substituição da casca por disco de micélio do fungo e imersão da raiz em suspensão de conídios de *Fusarium* sp., conforme descritas nos itens 2.1; 2.2; 2.3 ; 2.4. O isolado de *Fusarium* sp. SP5 foi utilizado, sendo selecionado em ensaio anterior como o mais agressivo. A incidência e a severidade da PBE foram avaliadas a cada sete dias após a inoculação das mudas de pupunheira.

Os tratamentos foram constituídos pelos quatro métodos de inoculação, dispostos em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições. Os dados relativos à incidência e severidade, foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

e) Inoculação por injeção em dois pontos no colo da planta

A injeção de suspensão conídios com agulha e seringa, já descrita no item 2.1, foi novamente utilizada com modificações quanto ao número de pontos a serem injetados (um e dois furos). O isolado mais agressivo foi utilizado (SP5).

Os tratamentos foram constituídos pelo número de pontos injetados e suas respectivas testemunhas, dispostos em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições, a avaliação foi realizada a cada sete dias após inoculação das mudas verificando-se os sintomas.

Os dados relativos à incidência e severidade de plantas sintomáticas obtidas para os tratamentos foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

f) Inoculação por imersão de raízes em suspensão de conídios de *Fusarium* sp. sob três diferentes intervalos de tempo em duas idades de plantas de pupunheira

O método de imersão de raízes podadas em suspensão de conídios foi realizada em duas idades diferentes: mudas com 8 meses de idade e plântulas com 4 meses (Figura 11). Os procedimentos de inoculação foram os mesmos da metodologia já descrita no item 2.4, no entanto, foram avaliados três intervalos: 30, 60 e 120 minutos.

Os tratamentos constituídos de duas idades de plantas de pupunheira submetidas a três intervalos de imersão das raízes em suspensão de conídios de *Fusarium* sp., seguindo o esquema fatorial 2 x 3 (idades x tempo), dispostas no delineamento inteiramente casualizado com dez repetições cada. Os resultados da incidência e severidade foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

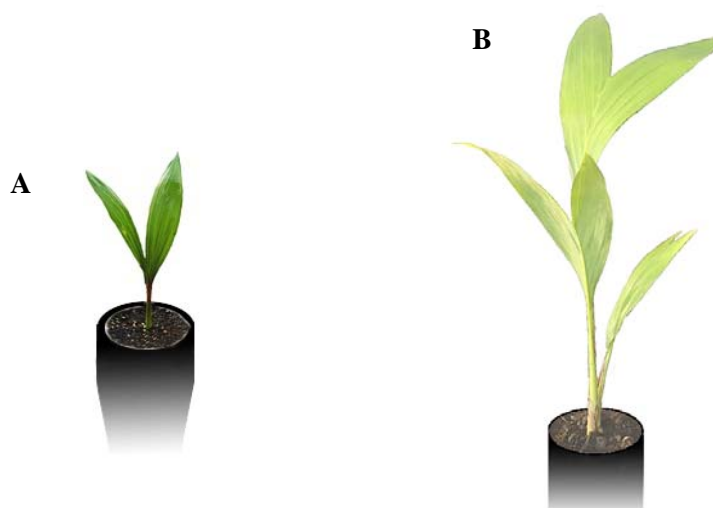


FIGURA 9. Representação gráfica do material vegetal em duas idades: plântula de pupunheira com 4 meses de idade (A); muda de pupunheira com 8 meses de idade (B).

g) Concentração ótima de suspensão de conídios de *Fusarium* sp. para inoculação pelos métodos de imersão e injeção

Quatro concentrações de suspensão de conídios de *Fusarium* spp. foram avaliadas pelos métodos de inoculação de imersão de raízes podadas de pupunheira em suspensão de conídios e injeção de suspensão de conídios. As concentrações testadas foram: $3,25 \times 10^3$; $3,25 \times 10^4$; $3,25 \times 10^5$; $3,25 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹. A incidência e a severidade da PBE foram avaliadas.

Os tratamentos foram constituídos pelas quatro concentrações da suspensão de conídios, dispostos em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições. Os dados relativos à incidência e a severidade de mudas com sintomas obtidos para os tratamentos, foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Experimento II

Patogenicidade de isolados de *Fusarium* sp.

Três isolados de *Fusarium* spp. foram obtidos a partir de sementes contaminadas e isolados em meio BDA, e, incubados em BOD por dez dias. Outro isolado de *Fusarium* sp. foi proveniente do isolamento de mudas de pupunheira com sintomas da PBE, conforme metodologia para isolamento descrita no item 1.2. Esses isolados foram utilizados em testes de inoculação em mudas de pupunheira a fim de avaliar sua patogenicidade.

Dois isolados da coleção de fungos do laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas, já comprovadamente patogênicos foram incorporados ao estudo (Tabela 1).

Os tratamentos foram constituídos pelos seis isolados, dispostos em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições. A inoculação foi realizada por meio da metodologia imersão de raízes de plântulas de pupunheira em suspensão de conídios de *Fusarium* sp., conforme descrita anteriormente no item 2.4.

Os dados relativos à incidência de e severidade de mudas com sintomas obtidos para os tratamentos, foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 1: Procedência e origem dos isolados de *Fusarium* spp. utilizados nos ensaios.

Isolado	Material	Origem
7A	Semente	Porto Velho - RO
1A	Semente	Porto Velho - RO
3A	Semente	Porto Velho - RO
10A	Mudas de pupunheira	Barra Velha - SC
SP3	Plântulas de pupunheira	Coleção da Embrapa
SP5	Plântulas de pupunheira	Coleção da Embrapa

Experimento III

Agressividade de 20 isolados de *Fusarium* spp. utilizando dois métodos de inoculação.

Neste experimento foram avaliados 20 isolados de *Fusarium* spp. da coleção de fungos do laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas quanto à sua agressividade.

Utilizou-se os seguintes métodos de inoculação: Injeção de suspensão conídios e inserção de palito de dente infestado com *Fusarium* spp., conforme descritos anteriormente nos itens 2.1 e 2.2, respectivamente.

Os tratamentos para o presente ensaio foram constituídos de 20 isolados de *Fusarium* spp., inoculados em mudas de por meio de duas metodologias, seguindo o esquema fatorial 20 x 2 (isolados x métodos de inoculação), dispostos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento. Foram realizadas avaliações da incidência e severidade das plantas sintomáticas a cada sete dias, após a inoculação.

Os dados relativos à incidência foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Experimento IV

Caracterização da evolução dos sintomas da PBE em pupunheira

A fim de avaliar a evolução dos sintomas da PBE em mudas e plântulas de pupunheira inoculadas com *Fusarium* spp., foi realizado um acompanhamento do desenvolvimento dos sintomas nas plantas. Os sintomas externos e internos da doença nas plantas inoculadas foram avaliados em diferentes idades do hospedeiro : plântulas com 4 meses de idade; mudas com 6 e 8 meses de idade.

Experimento V

Escala descritiva para avaliação da severidade da podridão da base do estipe (PBE)

Plantas de pupunheira em duas idades diferentes foram utilizadas para inoculação de *Fusarium* spp. e elaboração da escala descritiva, utilizando-se o material vegetal já descrito anteriormente (Figura 11), plântulas com 4 meses de idade, e mudas com 8 meses de idade.

As mudas com 8 meses de idade foram inoculadas por injeção de suspensão de conídios do isolado de *Fusarium* sp. mais agressivo (SP5). Enquanto que, as plântulas foram inoculadas por imersão das raízes podadas em suspensão de conídios na concentração de $3,25 \times 10^6$ conídios/mL⁻¹. A avaliação dos sintomas da PBE foi realizada semanalmente.

RESULTADOS & DISCUSSÃO

Comparação de três métodos de inoculação.

Os resultados obtidos através dos três métodos de inoculação de *Fusarium* spp. em mudas de pupunheira encontram-se nas Tabelas 3 e 4. No presente ensaio foi utilizado o isolado SAF2, previamente selecionado em ensaio de agressividade.

Neste ensaio preliminar de metodologias de inoculação, a incidência de plantas sintomáticas foi baixa, porém, a metodologia de injeção com suspensão de conídios atingiu os mesmos 40% de incidência (Tabela 3), obtidos no teste anterior de agressividade de isolados (Tabela 1).

TABELA 3. Incidência (%) de plantas de pupunheira com sintomas da PBE 90 dias após inoculação com *Fusarium* spp. com o uso de três metodologias de inoculação.

Tratamentos	Dias após inoculação - DAI												
	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84	90
Injeção	0	0	0	0	0	10	20	20	30	30	40	40	40
Furador	0	0	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Palito	0	0	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Não houve diferença significativa entre os tratamentos, exceto pela metodologia de injeção que apresentou a maior incidência média, diferindo se sua respectiva testemunha (Tabela 4).

TABELA 4. Médias de incidência de plantas inoculadas com *Fusarium* spp. por meio de três metodologias de inoculação diferentes, com sintomas da PBE.

Metodologia de inoculação	Médias de incidência comparadas por	
	Tukey a p <.5%	Duncan a p < 5%
Injeção	40,0 a	40,0 a
Furador	2,00 a	2,00 ab
Palito	2,00 a	2,00 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelos testes de Tukey, e Duncan a 5 % de probabilidade.

Os resultados obtidos com o uso da metodologia com substituição de disco da casca por disco de meio de cultura com micélio do fungo provocaram a morte de 20% das plantas do tratamento testemunha. Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Fuzitani (2012), que relatou a morte de 15 % das plantas testemunhas inoculadas com este método.

Costa et al. (2010) verificaram em estudos realizados com inoculação de patógenos por meio metodologia do palito infestado com micélio de fungo em colmos de milho (*Zea mays* L.) que, apesar de eficiente, ocorreram dificuldades na inoculação devido a perda de rigidez dos

palitos causada pela colonização do fungo. Esse fato dificultou o processo de inserção do palito no entrenó perfurado. Assim como no estipe da pupunheira no presente ensaio.

O isolado SAF 2 mostrou-se novamente ser moderadamente agressivo, e a metodologia de injeção teve ligeira superioridade em relação aos outros métodos, com as maiores incidências de plantas sintomáticas. Esta metodologia foi a única a não causar injúrias às plantas do tratamento testemunha (injetada com água na base do estipe). A metodologia de inoculação por injeção mostrou-se superior no presente ensaio, corroborando dados de Fuzitani (2012), que considerou a metodologia de injeção de suspensão de zoósporos de *P. palmivora* na base do estipe, o método de maior rapidez nos resultados e maior facilidade operacional.

Inoculação por injeção em quatro pontos no colo da planta

Apenas os tratamentos com três e quatro pontos foram eficientes para inoculação de *Fusarium* sp., porém, ambos ocasionaram injúrias às plantas do tratamento testemunha, inviabilizando tal procedimento de inoculação. O teste de comparação de médias foi significativo apenas para o tratamento com quatro pontos de injeção, tanto para a incidência quanto para a severidade (Tabela 5).

O método com três pontos demonstrou baixa eficiência na inoculação de *Fusarium* sp. em pupunheira, os demais tratamentos não causaram sintomas característicos da doença ou injúrias decorrentes da inoculação.

TABELA 5. Médias de incidência e severidade de mudas de pupunheira inoculadas pela metodologia de injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* sp. no colo da planta de um a quatro pontos pontos de incisão com agulha e seringa.

Tratamento	Incidência média	Severidade média
1 ponto	0,00 b	0,00 b
2 pontos	0,00 b	0,00 b
3 pontos	30,00 b	1,10 b
4 pontos	80,00 a	3,20 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Os resultados indicam que, a metodologia de injeção, quando modificada quanto ao número de furos para injeção de suspensão de conídios na base do estipe, pode facilitar a inoculação de *Fusarium* spp. em mudas de pupunheira, porém, esse método mostra-se danoso às plantas, causando injúrias de até 30 % de plantas do tratamentotestemunhas.

Inoculação por imersão da raiz em suspensão de conídios de *Fusarium* sp.

O tratamento realizado com o isolado SP3 em 30 minutos de imersão das raízes de mudas de oito meses de idade em suspensão de conídios de *Fusarium* sp., resultou na morte de todas as 10 plantas, obtendo-se nota 4 na escala descritiva da doença e, ao final do experimento, as plantas já encontravam-se em avançado estágio de decomposição. A testemunha deste mesmo tratamento apresentou quatro plantas com sintomas de amarelecimento das folhas, duas mortas e duas plantas com sintomas de amarelecimento nas folhas dois, três e quatro, sendo estas causadas por injúrias do método de inoculação.

No tratamento de uma hora de imersão das raízes de mudas de oito meses de idade em suspensão de conídios de *Fusarium* sp., foram observadas cinco plantas mortas (nota 4) e três plantas com nota 3, com as folhas bandeira, segunda e terceira já amarelecidas. Nas plantas do tratamento testemunha, observou-se três plantas com sintomas de amarelecimento nas folhas dois, três e quatro.

O tratamento de duas horas de imersão das raízes de mudas de oito meses de idade em suspensão de conídios de *Fusarium* sp., resultou em quatro plantas mortas (nota 4), mais quatro plantas sintomáticas com nota 3. Já a testemunha para o respectivo tratamento exibiu apenas duas plantas injuriadas, uma morta e a outra com amarelecimento nas folhas dois, três e quatro.

Nos tratamentos com o isolado SP5, obteve-se na inoculação em suspensão de conídios por 30 minutos, nove plantas mortas com nota 4. Na testemunha foi encontrada uma planta morta e quatro plantas com amarelecimento das folhas dois, três e quatro. Enquanto que, com o intervalo de tempo de uma hora de imersão, cinco plantas apresentaram nota 4 no tratamento inoculado, e três plantas com folhas dois, três e quatro amarelecidas em sua respectiva testemunha.

No último tratamento onde as plantas ficaram duas horas em imersão na suspensão de conídios, obteve-se ao final do experimento três plantas com nota 4. A testemunha deste tratamento apresentou duas plantas mortas.

Com o corte transversal feito no caule das plantas ao final do experimento, foi possível evidenciar que plantas não inoculadas sofreram danos e, mesmo que externamente exibindo sintomas de amarelecimento das folhas, não seguiam o mesmo padrão dos sintomas da doença, muitas vezes iniciando o amarelecimento das folhas da região mais externa para a interna.

Na comparação de médias obtida com o fatorial de isolados x tempos de imersão, apenas o tratamento de 30 minutos diferiu significativamente na incidência de plantas sintomáticas, sendo superior aos demais (Tabela 6), porém sua respectiva testemunha apresentou 40% de plantas injuriadas.

Não houve diferença entre os isolados (Tabela 7), conforme no experimento de agressividade de isolados (Tabela 1). Em uma análise fatorial (3 x 2), considerando os fatores: tempo de imersão e isolados, foram obtidas diferenças significativas para a suspensão de

conídios, comprovando a eficiência do método e, apesar de não diferir significativamente o intervalo de imersão por 30 minutos, ocasionou a maior incidência e severidade de plantas sintomáticas inoculadas.

Aparentemente, o transplantio destas mudas de oito meses de idade como realizado neste trabalho, do seu substrato inicial para outro, com raiz nua, mostra-se demasiadamente danoso para as raízes da planta, ocasionando sintomas de amarelecimento das folhas e provocando, em alguns casos, a morte da planta. Sabe-se que, de maneira geral, as mudas mais velhas (com mais de 5 meses) de pupunheira são intolerantes ao transplante. Dessa forma, fica evidenciado uma maior resistência de mudas jovens a este possível trauma em seu sistema radicular ao ser repicada do canteiro ou semeadora para outro substrato.

TABELA 6. Comparação das médias de incidência e severidade dos tratamentos:

Tratamento	Incidência Média ¹	Severidade média
30 min	90,00 a	3,60 a
1h	55,00 b	2,15 ab
2h	35,00 b	1,45 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade

TABELA 7. Médias de incidência e severidade obtidas nas plantas de pupunheira inoculadas por imersão de raízes em três intervalos de tempo diferentes, em suspensão de conídios de dois isolados de *Fusarium* sp.. Os dados foram avaliados em esquema de fatorial para os fatores: tempo de imersão e isolados.

Fatores e tratamentos	Incidência Média ¹	Severidade média ²
Tempo de imersão		
30 min	62,50 a	2,40 a
60 min	42,00 ab	1,57 ab
120 min	27,00 b	1,02 b
Isolados		
SP5	46,66 a	1,75 a
SP3	41,67 a	1,58 a

¹ Incidências médias de plantas sintomáticas para os dois isolados. ² severidade média das plantas sintomáticas obtida através do uso da escala de notas descritiva da doença (1 a 4). Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade

Avaliação de quatro métodos de inoculação.

Neste ensaio foi utilizado o isolado SP5 de *Fusarium* sp. da coleção de fungos da Embrapa Florestal, o qual foi selecionado ao término do ensaio de agressividade e patogenicidade de vinte isolados de *Fusarium* spp., como o mais agressivo (Tabela 3).

A análise estatística dos dados relativos a incidência de planta com sintomas da PBE, revelou que, quando comparadas pelo teste de Tukey a 5%, as médias de incidência de plantas sintomáticas não apresentaram diferenças significativas entre os métodos avaliados (Tabela 8).

Apenas o tratamento de injeção apresentou diferença significativa em relação a sua respectiva testemunha, porém não diferiu do tratamento por imersão. Os demais tratamentos não diferiram da testemunha. A maior incidência de plantas sintomáticas foi observada nas metodologias de injeção e imersão respectivamente.

Pode-se inferir que a metodologia de inoculação por imersão e injeção com dois pontos são eficientes, dada a alta incidência de plantas com sintomas da PBE nos tratamentos inoculados com o fungo, porém causando danos à testemunha.

TABELA 8. Médias de incidência e severidade da PBE em mudas de pupunheira inoculadas com *Fusarium* sp. por meio de quatro metodologias de inoculação.

Tratamentos	Incidência Média (%)	Severidade Média
Injeção	100,00 a	4,00 a
Furador	60,00 ab	1,46 c
Palito	53,33 b	0,93 c
Imersão	100,00 a	3,8 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

As médias revelam ser o tratamento por injeção o mais eficaz para este tipo de inoculação, ocasionado o menor número de plantas não inoculadas com sintomas, e o elevado número de inoculadas sintomáticas, seguido do tratamento por imersão. Porém, estes dois métodos, ainda assim, mostram-se demasiadamente drásticos às plantas que não resistem ao tratamento sem inóculo. Os tratamentos injeção e imersão causaram a morte de 100% das plantas, causando danos nas testemunhas na ordem de 33 a 73%, respectivamente (Tabela 8).

Foi observado que as mudas mais velhas (oito meses) não toleram ao transplante, uma vez que este stress pode ter contribuído para o aparecimento de sintomas na testemunha, conforme observado no teste anterior.

Inoculação por injeção em dois pontos.

Ambos os tratamentos, um e dois pontos de injeção na base do estipe, não apresentaram sintomas nas plantas do tratamento testemunha. A metodologia com dois pontos apresentou maior rapidez no aparecimento dos sintomas e maior valor para plantas inoculadas e sintomáticas (Tabela 11).

TABELA 11. Comparação das médias de incidência dos tratamentos um e dois pontos de injeção de suspensão de conídios de isolado de *Fusarium* spp em mudas de pupunheira.

Tratamentos	Incidência Média
Um ponto de injeção	40,00 ab
Dois pontos de injeção	70,00 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

A metodologia com um ponto de injeção de suspensão de conídios atingiu aos 42 dias após inoculação (DAI) sua incidência máxima registrada, quatro plantas sintomáticas (Figura 25), enquanto que, o tratamento com dois pontos de injeção já registrava seis plantas sintomáticas. Ambos os tratamentos iniciaram os sintomas entre 14 e 21 DAI, sendo o tratamento com um ponto com duas plantas sintomáticas e o tratamento com dois pontos com três plantas sintomáticas. No tratamento com dois pontos, aos 35 DAI, foram observadas seis plantas com sintomas, atingindo seu maior valor de incidência aos 56 dias.

O acompanhamento dos sintomas internos evidenciou que, os tratamentos testemunha, com um e dois pontos aos sete DAI (Figura 26 A e B) injetados com água na base do estipe, apresentaram poucas injúrias nos tecidos internos, sem apresentar alterações visuais externas na planta. Aos 14 DAI foi possível visualizar o início do escurecimento dos tecidos internos inoculados com a suspensão de conídios de *Fusarium* sp. (Figura 27). No tratamento com dois pontos de injeção da suspensão de conídios a podridão interna foi mais acentuada (Figura 27 B).

Aos 42 DAI foram verificadas plantas com sintomas internos e em estágio avançado da doença, para ambos os tratamentos inoculados com *Fusarium* sp., enquanto que, nas plantas do tratamento testemunha, apenas ligeiras injúrias aos tecidos internos, porém, sem causar sintomas externos às plantas.

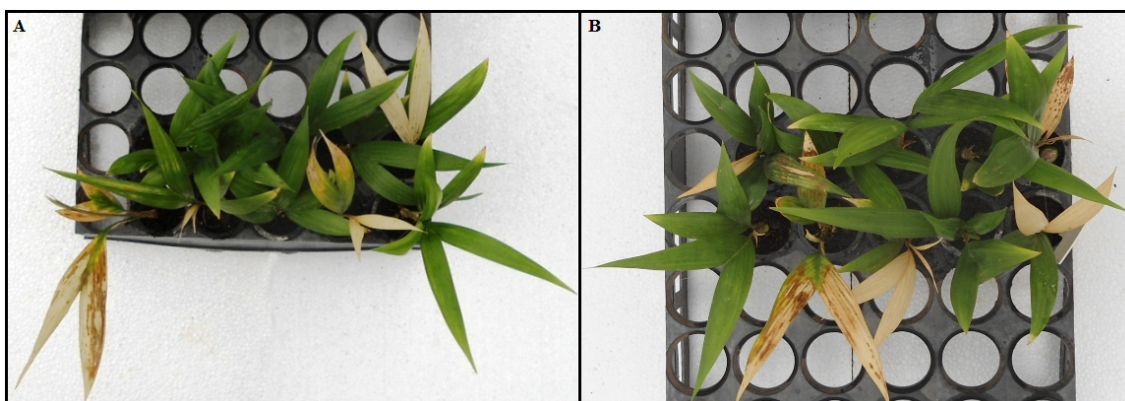


FIGURA 10. Vista de nível horizontal das plantas de pupunheira com 6 meses de idade aos 42 após inoculação por meio da metodologia de injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* sp.. A: Um ponto de injeção ; B: Dois pontos de injeção.



FIGURA 11. Corte transversal aos 7 dias após inoculação. A: Um ponto de injeção ; B: Um ponto de injeção testemunha; C: dois pontos de injeção; D: dois pontos de injeção testemunha.

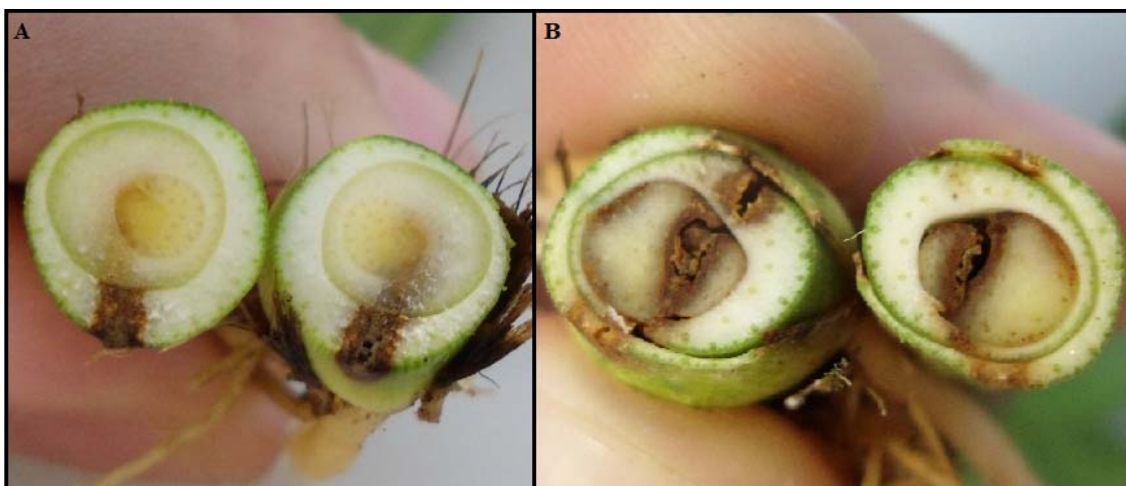


FIGURA 12. Corte transversal realizado no colo da planta das mudas de pupunheiras inoculadas com injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* sp. aos 14 dias com: um ponto de injeção (A); dois pontos de injeção (B).



FIGURA 13. Corte transversal realizado no colo da planta das mudas de pupunheiras aos 42 dias após inoculação com injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* sp. com: dois pontos de injeção; B: dois pontos de injeção testemunha; C: um ponto de injeção; D: dois pontos de injeção testemunha.

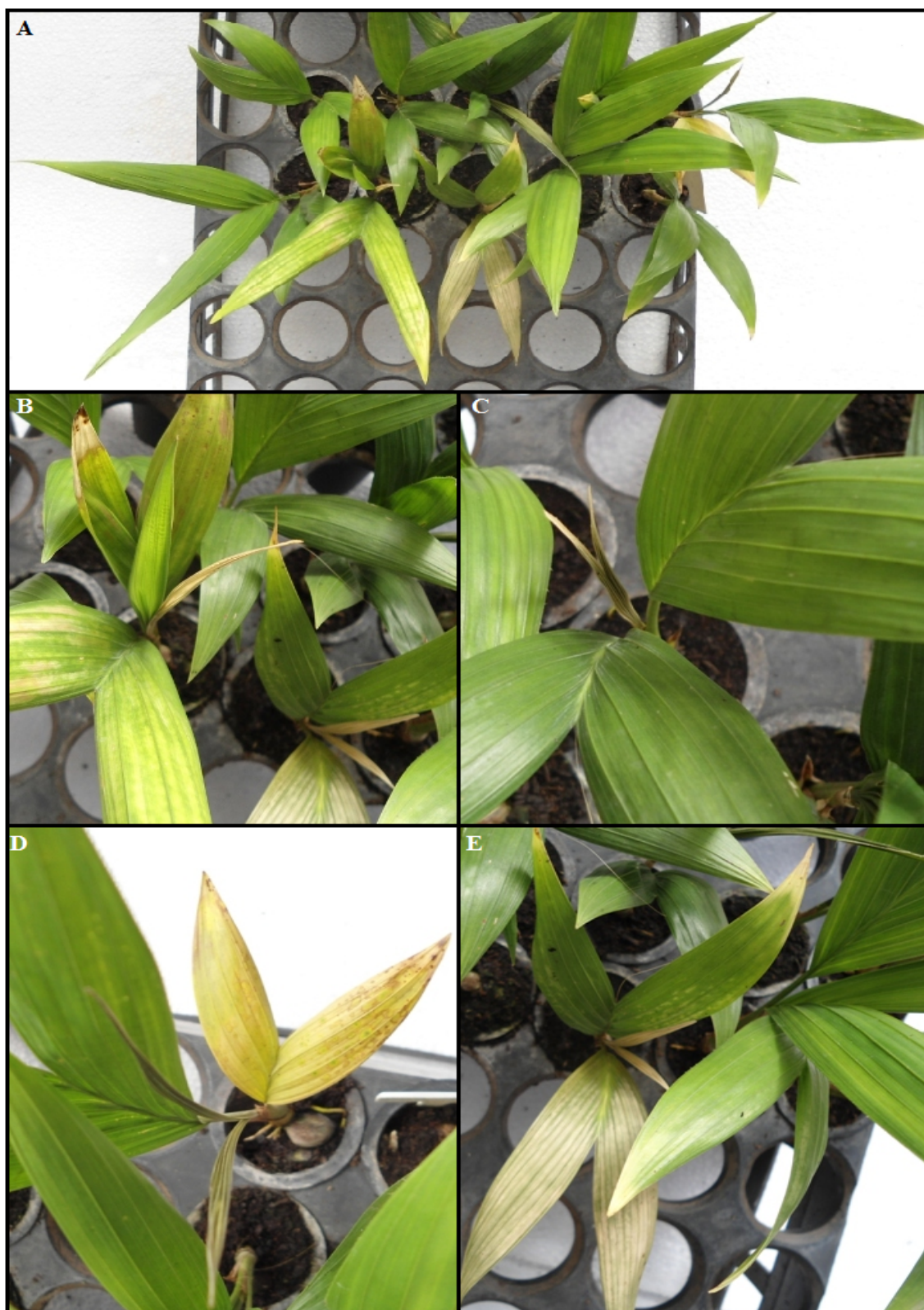


FIGURA 14. Mudas com 6 meses de idade submetidas a inoculação por injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* sp. com dois pontos aos 21 dias: detalhes do início do amarelecimento das folhas sempre iniciado pela folha bandeira e as demais a seguir da ponta da folha para o centro. A: vista geral do tratamento; B: plantas com sintomas, notas 1 e 2 respectivamente; C: planta com folha bandeira amarelecida - nota 1; D: Folhas um e dois amarelecidas, nota 2; E: Folha bandeira já amarelecida e início do amarelecimento da folha dois.

Inoculação por imersão de raízes em suspensão de conídios de *Fusarium* sp. sob três diferentes intervalos de tempo em duas idades de plantas de pupunheira

Optou-se pela avaliação dos dados separadamente para cada idade, pois além das unidades experimentais serem diferentes, o fatorial para tempo de imersão x idade, mascara o resultado satisfatório obtido para uma das idades avaliadas.

O estudo mostrou que a idade da planta influencia esta metodologia (imersão de raízes), não sendo confiável utilizar mudas velhas para esse método, pois como já visto em ensaios anteriores tais plantas sofrem stress devido ao transplante durante o teste, exibindo sintomas nas plantas controle sem inoculação (Tabela 12). Apesar da inoculação com *Fusarium* spp. ser eficiente, essa metodologia não é recomendada por apresentar danos à testemunha.

Já o método de imersão de plântulas com 120 de idade mostrou-se eficiente, com todos os tratamentos de inoculação do fungo diferindo das testemunhas injetadas com água, as quais, diferentemente das mudas, mostraram-se tolerantes ao destorroamento e transplantio para novo substrato.

TABELA 12. Médias da incidência de plantas sintomáticas inoculadas com *Fusarium* sp. e testemunhas injuriadas em duas idades de plantas avaliadas: plântulas com 4 meses de idade e mudas com 8 meses de idade.

Tratamentos	Plântulas		Mudas	
	com sintomas da PBE (%)	com injúrias (%)	com sintomas da PBE (%)	com injúrias (%)
30 min	100,00 a	-	100,00 a	-
30 min test	0	0	0	70,00
8h	80,00 a	-	100,00 a	-
8h test	0	10	0	50,00
16h	60,00 a	-	100,00 a	-
16h test	0	0	0	40,00

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

O número de plantas injuriadas para os tratamentos com mudas de 8 meses de idade tornou a análise fatorial inviável, pois forçava os dados a uma tendência errônea dado a dificuldade do discernimento nas plantas inoculadas como fungo quanto a seus sintomas ou injúrias devido ao método ser danoso a esta idade da planta.

Analizando separadamente o fator suspensão de imersão (Tabela 13) obteve-se significativa diferença entre a suspensão de conídios de *Fusarium* sp. e a imersão em água, demonstrando a eficácia do método em inocular o fungo na planta.

TABELA 13. Médias de incidência para plantas sintomáticas para o fator suspensão.

Tratamentos	Médias de incidência	
	Plântulas	Mudas
Inoculado com fungo	80,00 a	100,00 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Estudo de concentração para inoculação por imersão e injeção.

Para ambos os métodos de inoculação avaliados a concentração mais elevada, $3,25 \times 10^6$ conídios.mL⁻¹ obteve melhores resultados. Apesar de não diferir significativamente no teste de comparação de médias dos demais tratamentos inoculados com fungo, exceto o tratamento da concentração de 10^3 conídios.mL⁻¹ na metodologia de imersão, a concentração de 10^6 conídios.mL⁻¹ foi a única a diferir das respectivas testemunhas (Tabela 14) para as duas metodologias de inoculação testadas.

A metodologia de inoculação por injeção com dois pontos em mudas de pupunheira com 180 dias de idade mostra-se a metodologia mais eficiente para mudas mais velhas, com elevada acuidade e acurácia (Tabela 14).

O método de imersão de raízes podadas em suspensão de conídios de *Fusarium* spp. mostrou-se adequado em plântulas com 120 de idades, tolerantes ao stress do transplante das mesmas necessário nesta metodologia.

TABELA 14. Comparação de médias da incidência de plantas sintomáticas no estudo de concentração para as metodologias de inoculação por imersão e injeção.

Concentração	Médias de incidência (%)		Médias de severidade	
	Imersão	Injeção	Imersão	Injeção
10^3 conídios.mL ⁻¹	0,00 b	10,00 ab	0,00 b	0,30 b
10^4 conídios.mL ⁻¹	10,00 ab	30,00 ab	0,40 b	0,70 b
10^5 conídios.mL ⁻¹	40,00 ab	50,00 ab	1,30 a	2,00 a
10^6 conídios.mL ⁻¹	50,00 a	60,00 a	2,00 a	2,10 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade.

Patogenicidade e agressividade de isolados de *Fusarium* spp. obtidos a partir de sementes e mudas de pupunheira

O presente trabalho mostra os resultados da inoculação de seis isolados de *Fusarium* spp. por meio da metodologia de imersão de raízes podadas de plântulas de pupunheira em suspensão de conídios do patógeno. Os valores foram significativos apenas para para três isolados (Tabela 15).

Dos seis isolados avaliados apenas o isolados 7A não foi patogênico, e o isolado 10A apresentou apenas uma planta com sintomas da PBE. Os isolados SP3e SP5 mostraram-se novamente com maior agressividade em relação aos demais isolados (Figura 30), diferindo significativamente na agressividade de todos tratamentos (Tabela 15).

TABELA15. Médias de incidência e severidade dois cinco isolados de *Fusarium* spp. patogênicos inoculados em plantulas de pupunheira por meio de metodologia de imersão de raízes podadas em suspensão de conídios do patógeno.

Isolados	Incidência	Severidade
10A	10 b	0,4 b
SP3	40 a	1,6 a
SP5	60 a	2,3 a
1A	20 b	0,5 b
3A	30 a	0,8 b

Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro.

As espécies de *Fusarium* spp. encontradas no presente trabalho foram: *F. oxysporum*, *F. proliferatum* e *Fusarium solani* (Tabela 16). As espécies *F. oxysporum* e *Fusarium solani* já foram relatadas em pupunheira por Pizzinatto et al.(2001). Esses autores confirmaram a patogenicidade das seguintes espécies à pupunheira: *F. anthophilum*, *F.moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani* e *F. subglutinans*. Neste trabalho relata-se a inclusão da espécie *F. proliferatum*.

Os resultados da identificação dos isolados de *Fusarium* sp. obtidos neste trabalho foram realizadas pelo Prof. Dr. Dauri J. Tessmann (Universidade Estadual de Maringá).

TABELA 16. Isolados de *Fusarium* spp. utilizados nos ensaios, suas espécies e local de origem.

Isolado	Procedência	Espécie
7A	Semente	<i>F. oxysporum</i>
1A	Semente	<i>F. oxysporum</i>
3A	Semente	<i>Fusarium</i> sp.
10A	Mudas de pupunheira	<i>Fusarium solani</i> (complexo <i>F. solani</i>)
SP3	Plântulas de pupunheira	<i>F. proliferatum</i>
SP5	Plântulas de pupunheira	<i>F. proliferatum</i>

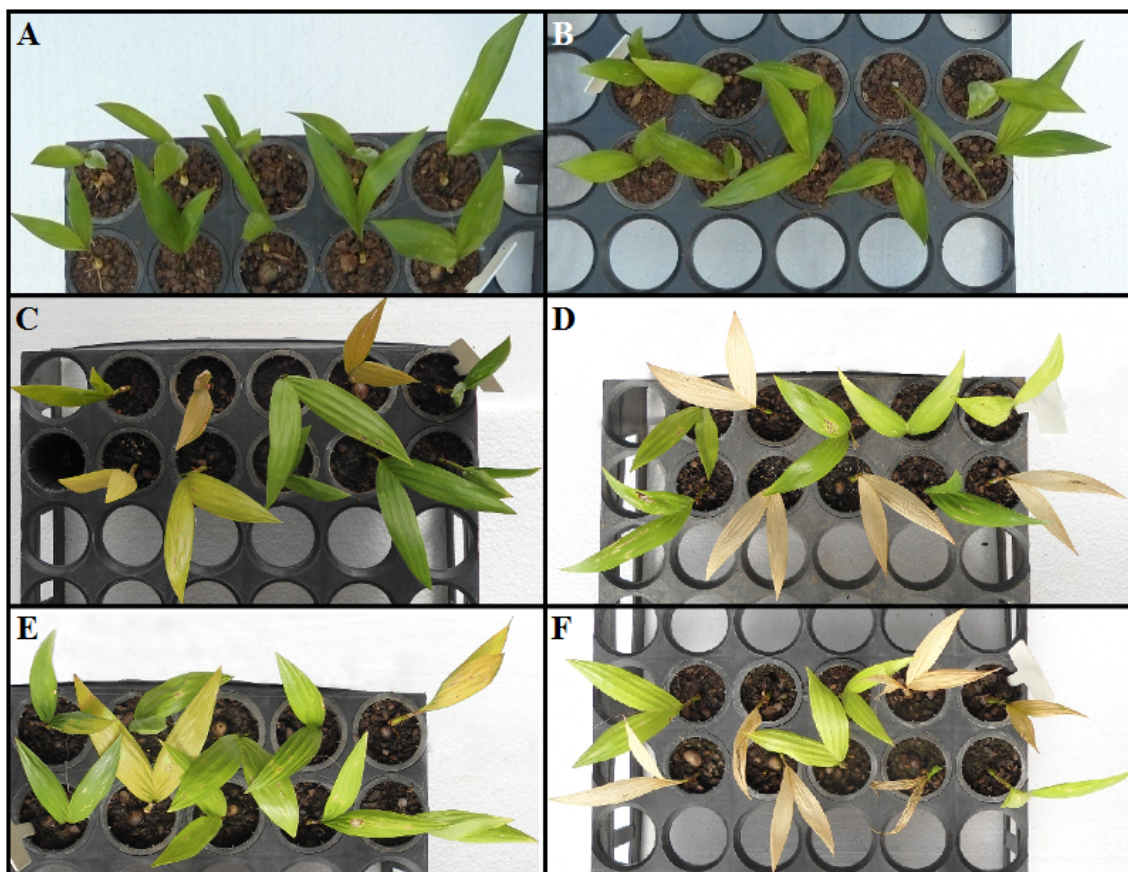


FIGURA 15. Plântulas de pupunheira com aproximadamente 4 meses de idade, 80 dias após a inoculação por imersão de raízes podadas em suspensão de conídios de *Fusarium* sp. na concentração de $3,25 \times 10^6$ conídios/mL⁻¹. Plantas do tratamento: testemunha (A e B); Plantas inoculadas com os isolados de *Fusarium* sp.: 3A (C); SP3 (D); 1A (E); e SP5 (F).

Agressividade de 20 isolados de *Fusarium* spp.

Nas plantas inoculadas com diferentes isolados de *Fusarium* spp. observou-se que os primeiros sintomas da PBR surgiram apenas na terceira avaliação, entre 14 e 21 dias após inoculação de *Fusarium* spp. (Tabela 1).

Os isolados apresentaram variações na agressividade e cerca de 50% dos isolados de *Fusarium* spp. avaliados não foram patogênicos, não se verificando a presença de sintomas nas plantas inoculadas (Tabela 1). Dos vinte isolados avaliados, apenas dois isolados (SP3 e SP5) causaram sintomas em pelo menos 50% das plantas inoculadas (Tabela 1).

O isolado SAF 2 foi o primeiro a causar sintomas da PBE em plantas inoculadas com *Fusarium* sp.; aos 21 dias após a inoculação (DAI) já haviam 20% de plantas com sintomas de amarelecimento da folha bandeira (Figura17).

TABELA 1. Médias de incidência e severidade das plantas de pupunheira inoculadas com 20 isolados de *Fusarium* spp. por meio de duas metodologias de inoculação do fungo.

Isolados		Severidade ¹	Incidência (%)
1	SP5	3,5 a	60,00 a
2	BG2	2,0 b	10,00 b
3	BG11	0,00	0,00
4	SAF8	0,00	0,00
5	BG12	0,00	0,00
6	BG14	1,00 b	10,00 b
7	BG15	0,00	0,00
8	BG21	0,00	0,00
9	BG23	2,00 b	20,00 ab
10	CA1	2,30 b	30,00 ab
11	CA2	2,00 b	10,00 b
12	CA3	2,75 ab	40,00 ab
13	SAF2	3,75 a	40,00 ab
14	SAF3	0,00	0,00
15	SAF4	0,00	0,00
16	SAF5	0,00	0,00
17	SAF6	0,00	0,00
18	SAF7	0,00	0,00
19	SP2	2,00 b	10,00 b
20	SP3	3,50 a	60,00 a
21	TEST	0,00	0,00

¹ Somatório da severidade das planta sintomáticas obtida através do uso da escala descritiva da doença, com notas variando de 0 a 4. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a nível de 5 % de probabilidade. CV(%) = 89,23; 68,12.

TABELA 2. Médias de incidência e severidade das plantas de pupunheira inoculadas com *Fusarium* spp. por meio das metodologias de inoculação de injeção de suspensão de conídios e palito infestado com micélio do fungo.

Métodos de Inoculação	Incidência (%)	Severidade ¹
Injeção	17,14 a	3,11 a
Palito	10,47 a	2,72 a

¹ Somatório da severidade das planta sintomáticas obtida através do uso da escala descritiva da doença, com notas variando de 0 a 4. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott a nível de 5 % de probabilidade. CV(%) 74, 56; 41,48.

Alguns isolados pouco agressivos foram observados (BG2, BG14, BG23, CA2, SP2), com incidência de 10 a 20% de plantas infectadas (Tabela 1). Houve também isolados moderadamente agressivos, com incidência de 20 a 30% das plantas inoculadas com sintomas da doença (CA1 e CA3), e isolados agressivos com incidência de 40 a 60% (SAF2, SP3, SP5) das plantas inoculadas apresentando sintomas (Tabela 1).

Os isolados de *Fusarium* spp., BG11, BG12, BG15, BG21, SAF3, SAF4, SAF5, SAF6, SAF7 e SAF8 não foram patogênicos.

Apenas dois isolados apresentaram agressividade alta e incidência e severidade elevados, SP5 e SP3. Apesar de não diferirem estatisticamente de outros tratamentos, foram considerados os isolados mais agressivos.

O isolado SAF 2 foi selecionado precocemente como o mais agressivo para ensaios preliminares de inoculação pois em ambas metodologias de inoculação, as plantas apresentaram sintomas mais rápidos e até então mais severos, em relação aos demais isolados testados (Figuras 19; 20 e 21).

Aos 28 DAI, o isolado SP3 provocou sintomas em duas plantas, com severidade na escala descritiva como nota 1, com apenas a folha bandeira amarelecida (Figura20). Aos 35 dias mais uma planta exibiu sintomas na folha bandeira (Figura 20). O isolado SP5 também provocou sintomas tardiamente, aos 56 DAI haviam quatro plantas com sintomas da PBE, com notas 1 e 2 na escala descritiva da doença (Figura 21).

Alves et al. (2006), verificaram que aos sete DAI não se observou alterações visíveis nas folhas das plantas inoculadas com os isolados de *Fusarium* spp.; apenas aos 14 DAI algumas plantas estavam mortas. No trabalho de Alves et al. (2006), a maioria dos isolados de *Fusarium* spp. testados foram considerados pouco agressivos à pupunheira.

Os resultados obtidos por Pizzinato et al. (2001), que inocularam plantas de pupunheira com cinco isolados de *Fusarium* spp., também observaram variações na agressividade dos isolados, causando a morte de cerca de 53 % de plantas jovens (45 dias de idade) e 14 % de plantas mais velhas (120 dias de idade).

Em relação aos métodos de inoculação usados neste trabalho, a metodologia por injeção possibilitou valores mais altos de severidade e incidência (Tabela2); porém, quando comparadas as suas médias, estas não diferiram estatisticamente. Na metodologia de inoculação com palito foram observadas plantas testemunhas com sintomas reflexos na folha devido a injúrias causadas pelo ferimento causado pelo método.

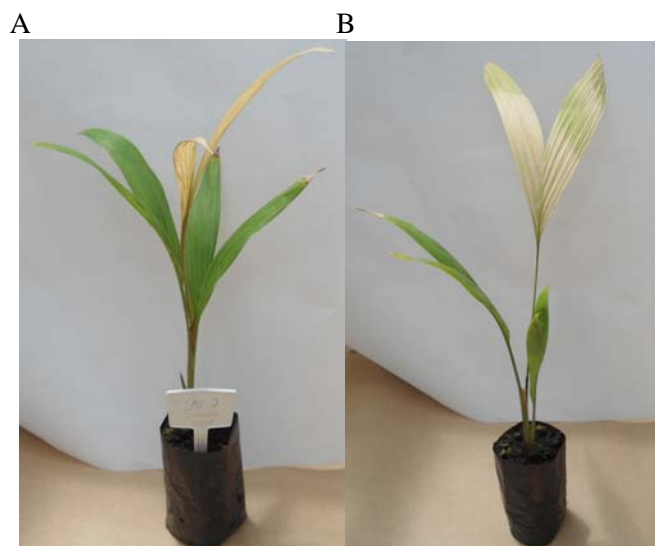


FIGURA 16. A e B: Plantas inoculadas por injeção com o isolado SAF 2 - 21 dias após inoculação.



FIGURA 17 Plantas inoculadas por injeção com isolado SP3 - 56 dias após inoculação.



FIGURA 18. Detalhe da folha bandeira seca na planta inoculada por injeção com o isolado SP5 - 35 dias após inoculação.

Caracterização sintomatológica da podridão da base do estipe (PBE) em pupunheira e escala descritiva

Algumas observações importantes devem ser feitas a respeito dos sintomas da podridão da base do estipe (PBE) nas plântulas de pupunheira. A ausência, em muitos casos, das folhas dois e três nas plântulas, pode dificultar a visualização do progresso da doença uma vez que os sintomas desenvolvem-se na única folha bífida visível (Figura 12A).

Foi observado que, nas plântulas, o amarelecimento da folha se dá a partir das pontas destas folhas para o centro da palmeira, até o ponto de inserção no estipe em formação (Figura 12B).

Diferentemente das mudas, nas plântulas a sequência das folhas sintomáticas toma papel secundário nesta escala, onde a cor da folha sintomática revela com maior clareza o grau de severidade em que esta se encontra, principalmente em plântulas com apenas uma folha aberta.

O tom da cor observado na plântula sintomática pode ser um fator mais relevante do que o número de eófilos (Figura 13A), o que facilita a definição do nível sintomático da doença na escala. A tonalidade das folhas é um indicador confiável e o mais indicado para avaliação da planta neste estágio fenológico onde, muitas vezes, não apresenta mais do que duas folhas. Uma plântula com folha parcialmente amarelecida (Figura 13B), mesmo que possuindo uma única folha é classificada com nota 2e, em outro caso, uma plântula com as folhas um e já murchas ou amarelecidas recebe nota 3.

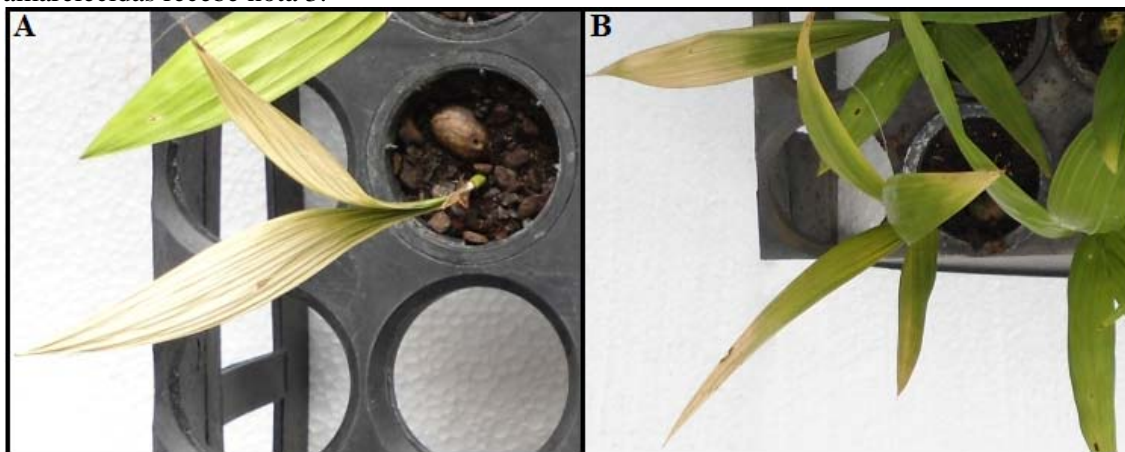


FIGURA 19. Plântulas de pupunheira com sintomas da PBE. **A:** nota 2, na folha bífida; **B:** nota 1, na folha bífida.

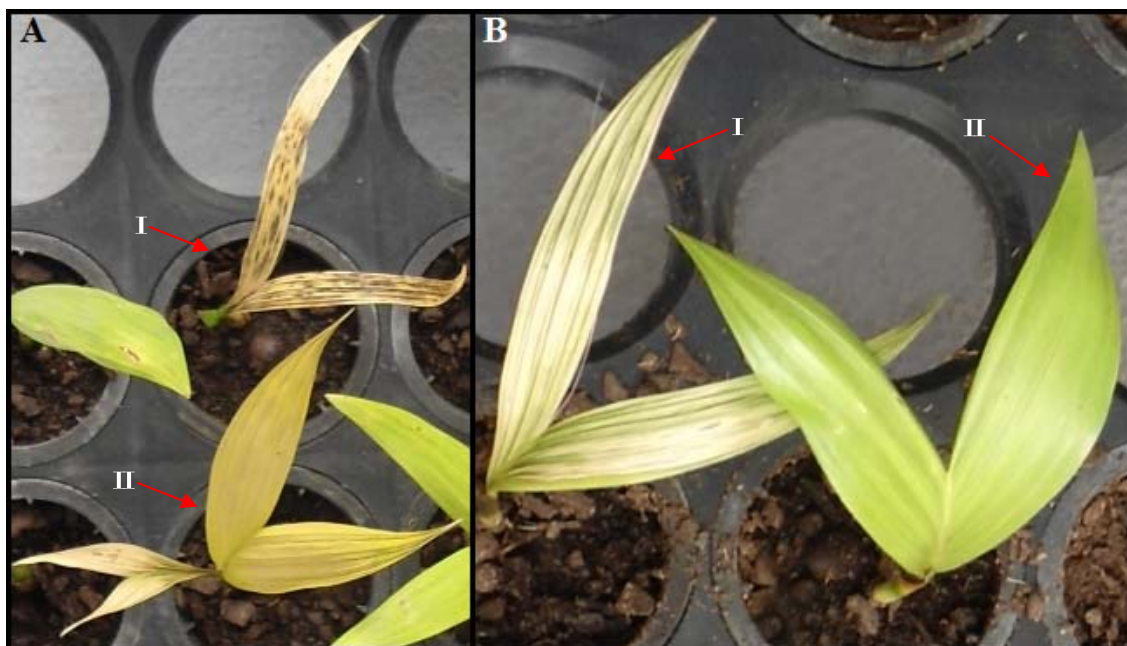
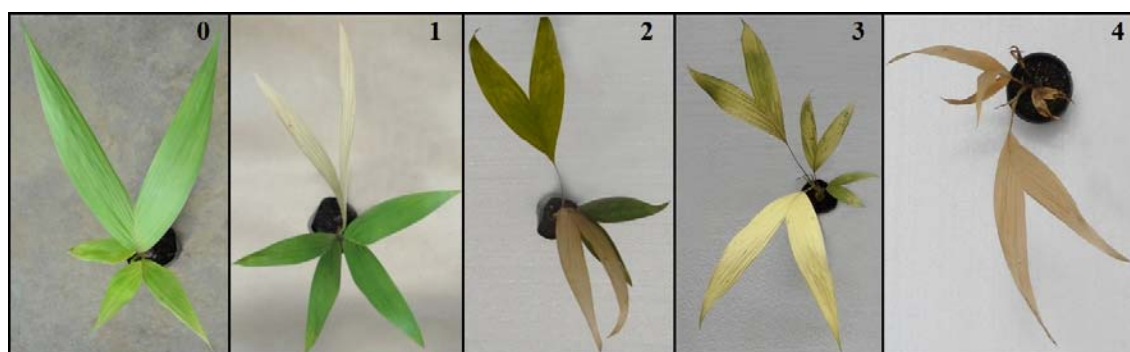


FIGURA 20. Plântulas de pupunheira em diferentes níveis do progresso da doença conforme escala descritiva de notas da PBE. **A:** Plântulas com nota 4 (seta I) e nota 3 (seta II); **B:** plântulas com nota 2 (seta I) e nota (seta II).

Foi obtida uma escala descritiva para quantificação da severidade da podridão da base do estipe (Figura 14), baseado na evolução dos sintomas da doença, sendo estes, amarelecimento da folha bandeira (sintoma inicial ou indicador), seguido pela morte da folha bandeira e/ou amarelecimento de folhas mais externas, e, por fim, a morte da planta.

As mudas com oito meses de idade foram inoculadas por injeção de suspensão de conídios de *Fusarium* spp. do isolado agressivo SP5, enquanto que, as plântulas com quatro meses de idade foram inoculadas por imersão das raízes podadas em suspensão de conídios. No entanto, os sintomas foram similares nos dois métodos.

A severidade da doença avaliada nas plantas inoculadas com *Fusarium* sp. resultou na elaboração da seguinte escala descritiva (Figura 14), com as notas: 0 = planta sem sintomas; 1 = planta com a folha bandeira e/ou primeira folha aberta murcha e/ou amarelecida; 2 = planta com a folha bandeira, primeira e segunda folhas murchas e/ou amarelecidas; 3 = planta todas as folhas com sintomas de murcha e/ou amarelecidas e 4 = planta morta.



Nota	Descrição dos sintomas
0	Planta sem sintomas
1	Planta com a folha bandeira e/ou primeira folha aberta com murcha e/ ou amarelecida
2	Planta com a folha bandeira, primeira e segunda folhas murchas e/ou amarelecidas
3	Planta com todas as folhas com sintomas de murcha e/ou amarelecidas
4	Planta morta

FIGURA 21. Escala descritiva para avaliação da severidade da Podridão da base do estipe, em mudas de pupunheira.

Os sintomas internos correspondentes às notas da escala descritiva para a PBE são vistos nas Figuras 14 a 17; estes evidenciam a colonização do fungo nos tecidos internos, embora muitas vezes a planta ainda não expresse os sintomas reflexos de amarelecimento e murcha das folhas (Figura 15 A). No início do desenvolvimento da doença, os danos internos podem ser verificados mediante corte do estipe na região de inoculação do fungo (Figura 15).

A injúria da injeção com agulha hipodérmica utilizada nesta metodologia causou danos de pequena proporção nos tecidos internos (Figura 14 B), das plantas do tratamento testemunha, sem ocasionar sintomas reflexos nas folhas das plantas ao longo do ensaio.

A planta ainda sem sintomas externos, classificada como nota zero conforme escala descritiva (Figura 15 A), e nota 1, com folha bandeira já murcha ou amarelecida (Figura 15B).

Ao atingir nota dois, com sintomas externos de murcha da folha dois, foram verificados danos internos (Figura 16 A). Em plantas com as folhas um e dois com sintomas de amarelecimento e murchas, pouco mais severas que a anterior, também classificada como nota 2 conforme escala descritiva, foram verificados os sintomas vistos na Figura 17 A.

Plantas com a nota três na escala descritiva, com todas as folhas murchas e ou amarelecidas, verificou-se os sintomas da Figura 17 A. Na avaliação de plantas com nota quatro, verificou-se podridão completa dos tecidos internos (Figura 17 B).

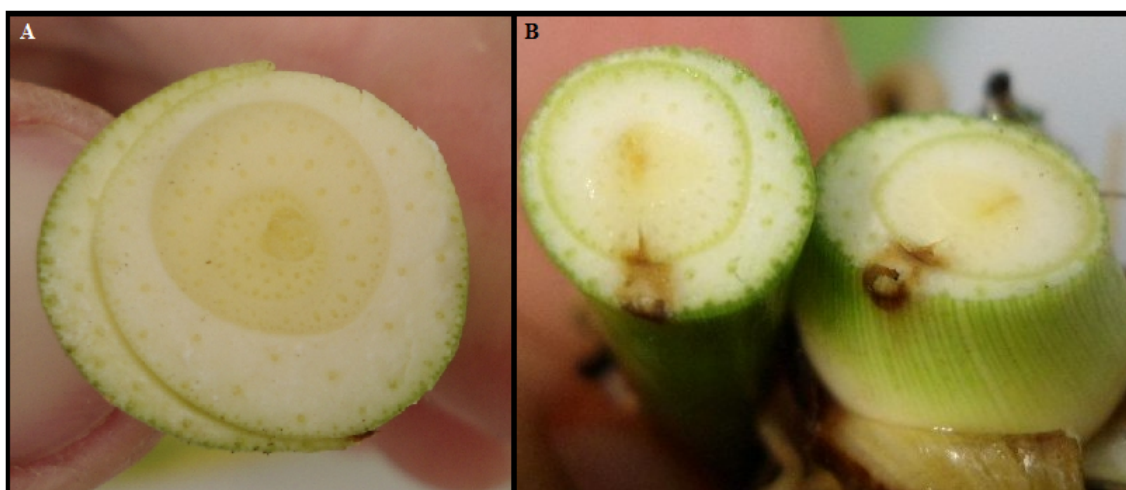


FIGURA 22. Corte transversal de mudas de pupunheira com 8 meses de idade. A: Planta sadia não inoculada; B: Planta testemunha na metodologia de injeção, sete dias após injeção de água.

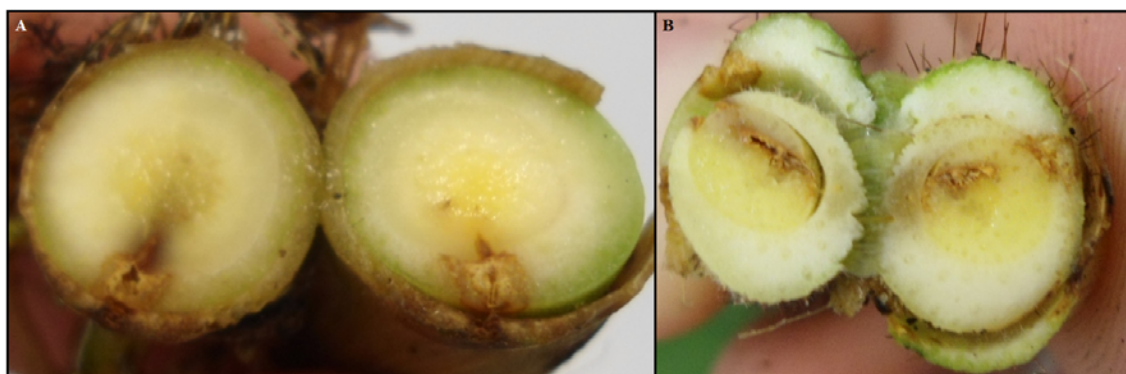


FIGURA 23. Corte transversal do estipe de mudas de pupunheira com 8 meses de idade inoculadas com *Fusarium* sp. por meio da metodologia de injeção de suspensão de conídios apresentando sintomas da PBE. A: sete dias após inoculação; B: 14 dias após inoculação.

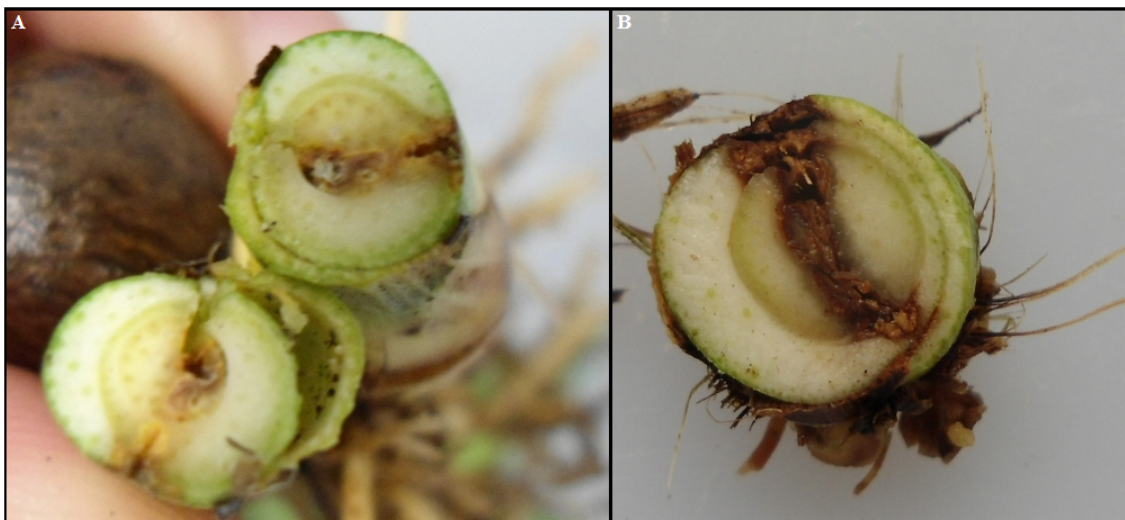


FIGURA 24. Corte transversal do estipe de mudas de pupunheira com 8 meses de idade inoculadas com *Fusarium* sp. por meio da metodologia de injeção de suspensão de conídios apresentando sintomas da PBE. A: 21 dias após inoculação; B: 28 dias após inoculação.

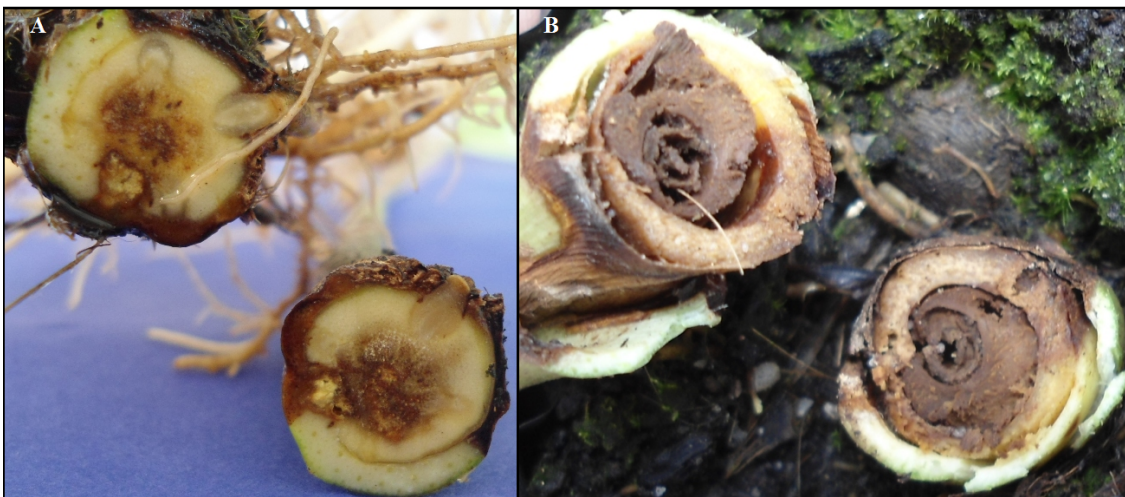
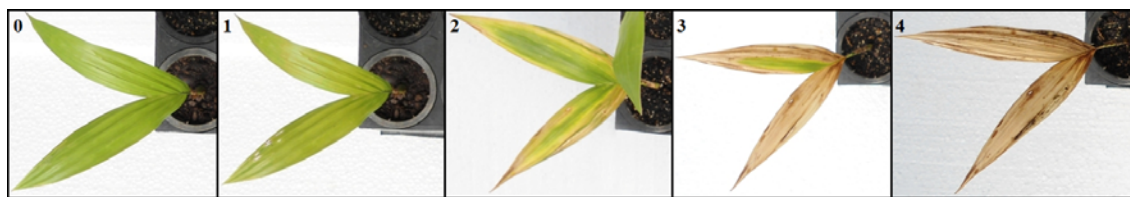


FIGURA 25. Corte transversal do estipe de mudas de pupunheira com 8 meses de idade inoculadas com *Fusarium* sp. por meio da metodologia de injeção de suspensão de conídios apresentando sintomas da PBE. A: 35 dias após inoculação; B: 42 dias após inoculação.

A fim de facilitar o entendimento do progresso externo da doença foi elaborada uma sequência visual das notas descritas anteriormente, no decorrer do tempo de uma plântula inoculada por imersão de raízes podadas em suspensão de um isolado de *Fusarium* spp.. Na Figura 18, pode-se observar que partindo do nível zero (plântula sem sintomas) no dia da inoculação, permanecendo sem sintomas até a nota 1 (início de murcha e amarelecimento da folha) aos 14 dias após inoculação (DAI), e nota 2 (murcha ou amarelecimento parcial da folha) aos 21 DAI, passando pela nota 3 (folha praticamente toda murcha ou amarelecida) aos 28 DAI, chegando a nota 4 (planta morta) aos 35 dias após a inoculação.



Nota	Descrição dos sintomas
0	Plântula sem sintomas
1	Plântula com primeira folha aberta com murcha ou amarelecimento
2	Plântula com folha(s) parcialmente murchas e/ou amarelecidas
3	Plântula com todas as folhas com sintomas de murcha e/ou amarelecidas
4	Plântula morta

FIGURA 26. Escala descritiva para avaliação da PBE em plântula de pupunheira.

Há uma escassez de trabalhos com escala para quantificação da PBE. Neste trabalho, a escala descritiva permitiu quantificar a PBE nos ensaios de métodos de inoculação e agressividade de isolados de *Fusarium* spp.

Em trabalhos com patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp., autores utilizam-se de critérios subjetivos e distintos para avaliação dos sintomas da doença em plantas inoculadas. Alves et al.(2006) observaram apenas as plantas mortas após inoculação dos sete aos 11 dias após inoculação do fungo. Ao término do experimento procedeu-se o corte transversal do estipe na região do ponto de inoculação para verificação dos sintomas internos.

Pizzinatto et al. (2001), avaliaram apenas incidência de plantas inoculadas com *Fusarium* sp. exibindo sintomas de amarelecimento nas folhas e necrose no colo, dez dias após inoculação das plantas.

CONCLUSÕES

- 1) Houve variações na agressividade dos isolados de *Fusarium* spp. de pupunheira;
- 2) Os métodos de inoculação por palito infestado com o patógeno, e do furador com substituição de disco da casca por disco de meio de cultura com micélio do fungo não foram eficazes na inoculação de *Fusarium* spp. em mudas de pupunheira;
- 3) O método de imersão de raízes em suspensão de cnídios mostrou-se eficaz e adequado para plântulas de pupunheira com quatro meses de idade.
- 4) A inoculação por injeção mostrou-se eficaz e adequada para mudas com seis meses de idade.
- 5) A escala descritiva de notas para PBE em pupunheira permitiu a avaliação da severidade da doença em diferentes idades da planta.
- 6) Foram identificados as seguintes espécies de *Fusarium* associadas e patogênicas à pupunheira: *F. oxysporum*, *F. proliferatum* e *Fusarium solani*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. A. R.; SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J. Análise da patogenicidade de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* à pupunheira. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 3., 2004, Colombo. **Anais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 1 CD-ROM. (Embrapa Florestas. Documentos, 102).
- ALVES, S. A. R.; SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. Patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. e *Phytophthora palmivora* associados com a podridão do estipe da pupunheira no Paraná. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 52, p. 133-140, jan./jun. 2006.
- BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V.; VON PINHO, R. G. Inoculação artificial de colmos de milho em diferentes idades e concentrações de inóculo e sua relação com a expressão da resistência a *Fusarium moniliforme*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 715-720, 2001.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygien**. 1939;24:270-6.
- CASTRO, N. R. *et al.* Ocorrência, métodos de inoculação e agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense em *Heliconia* spp. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 02, p. 127-130, 2008.
- CASTRO, N. R. **Murcha de *Fusarium* em *Heliconia* spp.: ocorrência, variabilidade e resistência genética em espécies ornamentais cultivadas em Pernambuco, Alagoas e Sergipe**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2007. 87 p.
- CAVALCANTI, L.S.; COELHO, R.S.B.; PEREZ, J.O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. **Ciência Rural** v.32, p.1-5. 2002.
- COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D. da; PARREIRA, D. F.; GUIMARÃES, P. E.; GUIMARÃES, L. J. M.; PARENTONI, S. N.; PACHECO, C. A. P. Métodos de inoculação de *Colletotrichum graminicola* em colmos de milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo. **Circular técnica**, 263). No prelo.

COSTA, C. J.; MARCHI, E. C. S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. (Embrapa Cerrados. Documentos, 229).

FUZITANI, E. J. **Integração de medidas de manejo da podridão da base de estipe em mudas de pupunheira**. UFPR, Curitiba, Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), 2012. 63 p.

KULCHETSKI, L.; GARDINGO, J. R. Aspectos ecológicos, botânicos e morfológicos. In: KULCHETSKI, L.; CAHIMSOHN, F. P.; GARDINGO, J. R. Palmito Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), Ponta Grossa, UEPG, p.148, 2001.

MORA-URPÍ, j. El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K): origem, biologia floral y manejo agronômico: In: **WORKSHOP ON UNDER UTILIZED PALMS TROPICAL AMERICA**, 43., 1983. Proceedings. p. 118-160.

MORA Urpí, J.; WEBER, J.C.; CLEMENT, C.R. 1997. Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth {Pupunheira}. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 20. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research - IPK, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute - **IPGRI**, Rome. 83p.

PIZZINATTO, M.A.; BOVI, M.L.A.; SPIERING, S.H.; BINOTTI, C.S. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica**, v.27, p.272-275, 2001.

RODRIGUES, A. S.; DURIGAN, M. E. O Agronegócio do palmito no Brasil – Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2007. **Circular Técnica**, 130.

SANTOS, A. F dos; TESMANN, D. J.; VIDA, J. B.; NUNES, W. M. C. As doenças da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth): Antracnose e Podridão da Medula. **Comunicado Técnico** 63, 2001.

SANTOS, A. F.; BEZERRA, J. L.; TESSMANN, D. J.; POLTRONIERI, L. S. Ocorrência de *Curvularia senegalensis* em pupunheira e palmeira-real no Brasil. **Fitopatologia Brasil**, v. 28, n. 2, 2003.

SANTOS, A. F. dos; LUZ, E. D. M. N.; FINATO, P. D.; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. Primeiro relato da podridão da estipe da pupunheira, causada por *Phytophthora palmivora*, no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 680-682, 2004a.

SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B.; NEVES, E. J. M.; KALIL FILHO, A. N.; MAFACIOLI, R. **Doenças da pupunheira no Estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004b. 4 p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 90).

SANTOS, A. F. dos ; TESSMANN, D. J. ; VIDA, J B ; SANTANA, D. L. Q. . Manejo Fitossanitário de Viveiros de Palmeiras para Palmito. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2007 (**Circular Técnica**).

SILVA, V. L.; MÔRO, F. V.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MÔRO, J. R.; SILVA, B. M. S.; CHARLO, H. C. O. Morfologia e avaliação do crescimento inicial de plântulas de *Bactris gasipaes* Kunth. (arecaceae) em diferentes substratos. **Rev. Bras. Frutic**, vol.28, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 3, p. 477-480, Dezembro 2006

SIVIERO A; MENTEN JOM. 1995. Uso do método do palito para inoculação de *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* em soja. **Summa Pytopathologica**. Jaguariúna, v.21, n:3-4, p. 259-260.

PIZZINATO, M. A.; BOVI, M. L. A.; SPIERING, S. H.; BINOTTI, C. S. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica**, v. 27, n. 2, p. 263-268, 2001.

TONET R. M.; FERREIRA, L. G. S.; OTOBONI, J. L. M. A. Cultura da Pupunheira. Campinas: CATI, 1999. 44 p. (**CATI. Boletim técnico**, 237).

VERZIGNASSI JR; VIDA JB; GASPAROTTO F; CORTEZ GLS; LORENZETTI ER; FARIA GS; TESSMANN DJ; SEVERINO JJ. 2004. Método do palito para inoculação de *Didymella bryoniae* em melão nobre e pepino “japonês”. **Fitopatol. Bras.**, Brasília, v. 29 (suplemento), p. 154.

WAITE, B.H., 1953. Inoculation studies and natural infection of banana varieties with races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. *cubense*. **Plant Disease Reporter** 61, 15-19.